Nessa Carey

LA REVOLUCIÓN EPIGENÉTICA

De cómo la biología moderna está reescribiendo nuestra comprensión de la genética, la enfermedad y la herencia

Índice

Introducción
Capítulo 1: Un sapo feo y un hombre elegante
Capítulo 2: Cómo aprendimos a rodar cuesta arriba
Capítulo 3: La vida tal como la conocíamos
Capítulo 4: La vida tal como la conocemos
Capítulo 5: ¿Por qué los gemelos idénticos no son realmente idénticos?
Capítulo 6: Los pecados de los padres
Capítulo 7: El juego de las generaciones
Capítulo 8: La batalla de los sexos
Capítulo 9: Generación X
Capítulo 10: El mensaje no es el medio
Capítulo 11: Luchando contra el enemigo interior
Capítulo 12: Todo está en la mente
Capítulo 13: Yendo cuesta abajo
Capítulo 14: Larga vida a la reina
Capítulo 15: La revolución verde
Capítulo 16: Caminos futuros

NESSA CAREY

LA REVOLUCIÓN EPIGENÉTICA

De cómo la biología moderna está reescribiendo nuestra comprensión de la genética, la enfermedad y la herencia

TRADUCCIÓN DE JOSEP SARRET GRAU

BIBLIOTECA BURIDÁN

NESSA CAREY

La revolución epigenética

© Nessa Carey, 2011

The author has asserted her moral rights

Edición Propiedad de Ediciones de Intervención Cultural/Biblioteca Buridán

Juan de la Cierva 6, 08339, Vilassar de Dalt (Barcelona)

Diseño: Miguel R. Cabot

ISBN: 97884-16995-46-2

ADN

Leyendo determinados textos de biología es habitual deducir que estas tres letras lo explican todo. Estas son, por ejemplo, solo unas cuantas de las muchas afirmaciones que se hicieron el 26 de junio del año 2000, cuando los investigadores anunciaron que el genoma humano había sido secuenciado[1]:

> *Hoy estamos aprendiendo el lenguaje con el que Dios creó la vida.* **Bill Clinton**, presidente de Estados Unidos
>
> *Ahora tenemos la posibilidad de conseguir todo lo que siempre hemos esperado que nos daría la medicina.* **Lord Sainsbury**, ministro de Ciencia británico
>
> *La secuenciación del genoma humano se ha comparado con la proeza de poner a un hombre en la Luna, pero yo creo que es mucho más que esto. Este es no solo uno de los logros más destacados de nuestra época, sino también de la historia humana en general.* **Michael Dexter**, director de la fundación benéficaWellcome Trust

A juzgar por estas citas, y otras muchas parecidas, podríamos pensar que los investigadores podían muy bien haberse relajado un poco a partir de junio del año 2000 porque la mayor parte de los problemas de salud de la humanidad parecían poder resolverse de un modo relativamente fácil. Al fin y al cabo, teníamos ahora en nuestras manos el programa o cianotipo de la humanidad. Lo único que necesitábamos era entender un poco mejor este conjunto de instrucciones para resolver unos cuantos detalles.

Lamentablemente, estas afirmaciones han demostrado ser, en el mejor de los casos, algo prematuras. La realidad es bastante diferente.

Solemos hablar del ADN como si fuese una plantilla o una especie de molde como los que se usan en las fábricas de automóviles para fabricar componentes. En la fábrica se vierte miles de veces plástico o metal fundido en un molde y, a menos que algo salga mal en el proceso, se producen miles de piezas o componentes idénticos.

Pero el ADN no es en realidad como un molde. Se parece más a un guión. Piensen en Romeo y Julieta, por ejemplo. En 1936 George Cukor dirigió a Leslie Howard y a Norma Shearer en una versión fílmica de esta obra de Shakespeare. Sesenta años después Baz Luhrmann dirigió a Leonardo DiCaprio y a Claire Danes en otra versión cinematográfica de esa misma obra. Ambas producciones utilizaron como punto de partida el texto de Shakespeare, pero las dos películas son muy distintas. Idéntico punto de partida, resultados diferentes.

Esto es lo que sucede cuando las células leen el código genético contenido en el ADN. El mismo guión puede dar como resultado dos producciones diferentes. Las implicaciones que esto tiene para la salud humana son de gran alcance, como veremos en los diversos estudios que vamos a examinar dentro de un momento. En todos estos estudios es muy importante recordar que no hubo nada que afectase al ADN de las personas implicadas en los mismos. Su ADN no sufrió ningún cambio (ninguna mutación), y sin embargo sus historias vitales se vieron irrevocablemente alteradas en respuesta a sus entornos.

Audrey Hepburn fue una de las grandes estrellas cinematográficas del siglo XX. Esbelta, elegante y con una estructura ósea encantadoramente delicada y casi frágil, su papel como Holly Golightly en Desayuno en Tiffany's la convirtió en un icono, incluso para aquellos que no han visto nunca esa película. Resulta asombroso pensar que esta increíble belleza fue la creación de una situación realmente terrible. Audrey Hepburn fue una de las supervivientes de un acontecimiento de la Segunda Guerra Mundial que se conoce como la "hambruna invernal holandesa". Esta situación terminó cuando Audrey Hepburn tenía dieciséis años, pero los efectos secundarios de la misma, incluida una salud física precaria, la acompañaron durante el resto de su vida.

La Hambruna Invernal Holandesa duró desde comienzos de noviembre de 1944 a finales de la primavera de 1945. Fue un periodo tremendamente frío en Europa Occidental, lo que provocó aún más penurias en un continente que ya había sido devastado por cuatro años de guerra brutal. Y en ningún lugar fue peor que en la parte occidental de los Países Bajos, que en esa época todavía estaba bajo control alemán. Un bloqueo alemán tuvo como consecuencia una catastrófica caída en la disponibilidad de comida para la población holandesa. En un momento determinado la población estuvo tratando de sobrevivir con solo un 30 por ciento de la ingesta diaria normal de calorías. La gente comía hierba y bulbos de tulipán, y quemaba cualquier pedazo de mueble que caía en sus manos, en un desesperado intento de permanecer con vida. Más de 20.000 personas habían muerto cuando en mayo de 1945 se restableció el suministro normal

de alimentos.

Las terribles privaciones de este período también dieron lugar a un importante estudio científico de la población. Los supervivientes holandeses eran un grupo bien definido de individuos, todos los cuales habían sufrido un solo período de desnutrición, y todos ellos lo habían sufrido al mismo tiempo. Debido a la existencia en Holanda de una excelente infraestructura sanitaria y de un registro de casos igualmente excelente, los epidemiólogos han podido seguir los efectos a largo plazo de la hambruna. Sus descubrimientos fueron totalmente inesperados.

Uno de los primeros aspectos estudiados fue el efecto de la hambruna en los pesos al nacer de niños que habían estado en el vientre de sus madres durante aquel terrible período. Si una madre se había alimentado normalmente durante la época de la concepción y había padecido desnutrición solo durante los últimos meses del embarazo, lo más probable era que su hijo naciese pequeño. Si, por otro lado, la madre había sufrido desnutrición solo durante los tres primeros meses del embarazo (debido a que el bebé había sido concebido hacia el final de aquel terrible episodio) y luego se había podido alimentar correctamente, lo más probable era que tuviese un hijo con un peso corporal normal. El feto "recuperaba" el peso perdido.

Todo esto parece muy sencillo, pues estamos acostumbrados a la idea de que los fetos completan la mayor parte de su desarrollo durante los últimos meses del embarazo. Pero los epidemiólogos han podido estudiar a estos grupos de niños durante varias décadas y lo que han encontrado es realmente sorprendente. Los niños que habían nacido pequeños siguieron siendo bajos durante toda su vida, con unos índices de obesidad muy inferiores a los de la población en general. Durante cuarenta o más años, estas personas tuvieron acceso a tanta comida como deseaban, y sin embargo sus cuerpos nunca llegaron a reponerse de aquel período temprano de desnutrición. ¿Por qué? ¿Cómo fue posible que estas experiencias vitales tempranas afectasen a esos individuos durante décadas? ¿Por qué no pudieron estas personas alcanzar un peso normal una vez que su entorno volvió a ser como tenía que ser?

De un modo todavía más inesperado, los niños cuyas madres habían sufrido desnutrición solo durante una fase temprana del embarazo tenían unos índices de obesidad superiores a lo normal. Estudios recientes han puesto de manifiesto una incidencia aún mayor de otros problemas de salud, incluidas determinadas pruebas de actividad mental. Aunque estos individuos parecían estar perfectamente sanos al nacer, algo había sucedido durante su desarrollo en el útero que les había afectado durante décadas. Y no era solo el hecho de que había

sucedido algo importante; era igualmente importante el momento en que había sucedido. Los acontecimientos que tienen lugar durante los tres primeros meses de desarrollo, una fase en que el feto es realmente muy pequeño, pueden afectar a un individuo para el resto de su vida.

Y de un modo todavía más extraordinario, algunos de estos efectos parecen estar presentes en los hijos de este grupo, es decir, en los nietos de las mujeres que padecieron desnutrición durante los tres primeros meses de su embarazo. Así pues, algo que sucedió en una población de embarazadas afectó a los hijos de sus hijos. Esto planteó el problema realmente desconcertante de cómo habían pasado estos efectos a las generaciones subsiguientes.

Consideremos una historia humana diferente. La esquizofrenia es una enfermedad mental terrible que, de no ser tratada, puede abrumar e inhabilitar completamente a la persona afectada. Los que sufren esta enfermedad pueden presentar una gama muy variada de síntomas, incluidos delirios, alucinaciones y dificultades enormes para concentrarse mentalmente. Las personas aquejadas de esquizofrenia pueden llegar a ser completamente incapaces de distinguir entre el "mundo real" y su propio mundo ilusorio y alucinatorio. Las respuestas cognitivas, emocionales y sociales normales se pierden. Hay un error terrible muy extendido: el de que las personas con esquizofrenia pueden ser violentas y peligrosas. Para la mayoría de pacientes, este no es en absoluto el caso, y las personas que tienen más probabilidades de sufrir daños a causa de esta enfermedad son los propios pacientes. Los individuos aquejados de esquizofrenia tienen una probabilidad cincuenta veces mayor de cometer suicidio que los individuos sanos[2].

La esquizofrenia es una enfermedad trágicamente común. Afecta entre un 0,5 y un 1 por ciento de la población en la mayor parte de países y culturas, lo que significa que posiblemente haya más de cincuenta millones de personas actualmente vivas que padecen esta enfermedad. Los científicos saben desde hace tiempo que la genética desempeña un papel importante a la hora de determinar si una persona va a desarrollar esta enfermedad. Sabemos esto porque si uno de los dos miembros de una pareja de gemelos idénticos padece esquizofrenia, el otro tiene un cincuenta por ciento de probabilidades de padecerla. Este es un porcentaje de riesgo muy superior al del 1 por ciento de riesgo en la población en general.

Los dos miembros de una pareja de gemelos idénticos tienen exactamente el mismo código genético. Comparten el mismo útero y generalmente son criados en entornos muy similares. Considerando esto, no tiene nada de sorprendente que si uno de los gemelos desarrolla esquizofrenia, la probabilidad de que también lo haga el otro gemelo sea muy alta. De hecho, hemos de empezar

preguntándonos por qué no es aún más alta. ¿Por qué no es de un 100 por ciento? ¿Cómo es posible que dos individuos aparentemente idénticos puedan llegar a ser muy diferentes? Un individuo tiene una enfermedad mental devastadora, pero ¿sufrirá también su gemelo idéntico esa misma enfermedad? Echemos una moneda al aire: si sale cara, no; si sale cruz, sí. Las variaciones ambientales difícilmente pueden explicar esto, y aunque pudieran hacerlo, ¿cómo podrían tener efectos tan profundamente diferentes sobre dos personas genéticamente idénticas?

Veamos un tercer ejemplo. Un niño pequeño, de menos de tres años de edad, es maltratado y desatendido por sus padres. Finalmente, el Estado interviene y el niño es apartado de sus padres biológicos y confiado a unos padres adoptivos o enviado a una familia de acogida. Sus nuevos cuidadores le dan amor y cariño al niño, haciendo todo lo que pueden para proporcionarle un hogar seguro y lleno de afecto. El niño pasa con estos nuevos padres el resto de su infancia y adolescencia y los primeros años de su vida adulta. Algunas veces todo les va bien a estas personas, que crecen hasta convertirse en individuos felices y estables, totalmente indistinguibles de aquellas personas que han tenido infancias normales y que no han sido maltratadas. Pero a menudo, desgraciadamente, las cosas no siguen este guión. Los niños que han sufrido malos tratos y carencias afectivas en su primera infancia tienen al crecer un riesgo sustancialmente superior al de la población en general de tener problemas de salud mental. Con frecuencia el niño se convierte en un adulto con un alto riesgo de tener problemas de depresión, auto-odio, drogadicción y suicidio.

Una vez más, hemos de preguntarnos por qué. ¿Por qué es tan difícil anular los efectos de la exposición a la falta de cariño y a los malos tratos en la primera infancia? ¿Por qué algo que sucedió al comienzo de una vida tiene efectos en la salud mental que pueden ser todavía evidentes décadas más tarde? En algunos casos, es posible que el adulto no tenga absolutamente ningún recuerdo de los hechos traumáticos de su infancia y sin embargo puede que sufra mental y físicamente las consecuencias de los mismos durante el resto de su vida.

Superficialmente, los tres casos citados son muy distintos. El primero tiene que ver sobre todo con la nutrición, especialmente con la del niño antes de nacer. El segundo tiene que ver con las diferencias que surgen entre individuos genéticamente idénticos. El tercero es acerca de los daños psicológicos a largo plazo que son consecuencia de los malos tratos durante la infancia.

Pero estos tres casos están relacionados a un nivel biológico muy fundamental. Todos ellos son ejemplos de epigenética. La epigenética

es la nueva disciplina que está revolucionando la biología. Cuando dos individuos genéticamente idénticos no son idénticos de alguna forma que podemos medir, esto se llama epigenética. Cuando un cambio ambiental tiene consecuencias biológicas que persisten mucho tiempo después de que dicho cambio se haya desvanecido en la memoria distante, estamos asistiendo a un efecto epigenético.

Los fenómenos epigenéticos son perceptibles a diario a nuestro alrededor. Los científicos han identificado muchos ejemplos de epigenética, como los descritos más arriba, desde hace muchos años. Cuando los científicos hablan de epigenética se están refiriendo a todos aquellos casos en los que el código genético por sí solo no basta para describir lo que sucede –hace falta algo más.

Esta es una de las formas en que puede definirse científicamente la epigenética, en la que cosas que son genéticamente idénticas pueden parecer realmente muy diferentes unas de otras. Pero tiene que existir un mecanismo que produzca esta diferencia entre el guión genético y el resultado final. Estos efectos epigenéticos tienen que ser causados por algún tipo de cambio físico, alteraciones en la extensa serie de moléculas que forman las células de todos los organismos vivos. Esto nos lleva a la otra forma de enfocar la epigenética –la descripción molecular de la misma. En este modelo, la epigenética puede definirse como el conjunto de modificaciones en nuestro material genético que cambian la forma en que los genes se activan y desactivan, pero que no alteran a los propios genes.

Aunque puede parecer confusionista que la palabra “epigenética” tenga dos significados diferentes, el caso es que estamos describiendo el mismo acontecimiento a dos niveles diferentes. Es como mirar las fotografías de un periódico con una lupa y comprobar que están hechas a base de puntos. Si no tuviéramos una lupa podríamos pensar que cada imagen era de una sola pieza y probablemente nunca hubiéramos podido descubrir cuántas imágenes nuevas podían crearse cada día. Por otro lado, si lo único que hiciéramos fuese mirar a través de una lupa, siempre veríamos puntos y nunca la increíble imagen que forman juntos y que podemos ver simplemente retrocediendo un poco y contemplando el conjunto que forman.

La revolución que se ha producido recientemente en biología consiste en que por primera vez empezamos realmente a entender cómo se forman estos asombrosos fenómenos epigenéticos. Ya no vemos solamente la imagen de conjunto, también podemos analizar los puntos individuales que la forman. Esto significa que finalmente estamos empezando a desvelar el eslabón perdido entre naturaleza y crianza; cómo nos habla nuestro entorno y cómo nos cambia, a veces para siempre.

El prefijo “epi” que aparece en la palabra epigenética deriva del

griego y significa “en”, “sobre” o “junto a”. El ADN de nuestras células no es una molécula pura y no adulterada. Pequeños grupos químicos pueden acoplarse a regiones específicas del ADN. Nuestro ADN también está cubierto de proteínas especiales. Estas proteínas, a su vez, pueden estar cubiertas de pequeñas sustancias químicas adicionales. Ninguna de estas enmiendas moleculares cambia el código genético subyacente. Pero el hecho de añadir estos grupos químicos al ADN, o a las proteínas asociadas, o el hecho de eliminarlos, cambian la expresión de los genes cercanos. Estos cambios en la expresión del gen modifican las funciones de las células e incluso la naturaleza de las mismas. A veces, si estas pautas de modificaciones químicas se producen en períodos críticos en el desarrollo, pueden quedar establecidas para el resto de nuestras vidas, aunque vivamos más allá de los cien años.

Nadie discute que el programa del ADN es un punto de partida. Un punto de partida muy importante y absolutamente necesario, sin duda. Pero no es una explicación suficiente para la a veces maravillosa y a veces espantosa complejidad de la vida. Si la secuencia de ADN fuese lo único importante, los gemelos idénticos serían siempre absolutamente idénticos en todos los sentidos. Los niños nacidos de madres desnutridas ganarían peso con la misma facilidad que los niños que han tenido un comienzo en la vida más sano. Y como veremos en el capítulo 1, todos seríamos como enormes gotas amorfas, porque todas las células de nuestro cuerpo serían completamente idénticas.

Áreas enormes de la biología están influidas por los mecanismos epigenéticos, y la revolución en nuestra forma de pensar se está extendiendo cada vez más hacia fronteras inesperadas de la vida en nuestro planeta. Entre los ejemplos que vamos a encontrar en este libro se incluyen cosas como: ¿por qué no podemos crear un niño a partir de dos espermatozoides o de dos óvulos, sino que necesitamos tener un espermatozoide y un óvulo? ¿Qué hace posible la clonación? ¿Por qué es tan difícil la clonación? ¿Por qué algunas plantas necesitan un período de frío antes de florecer? Teniendo en cuenta que las abejas reinas y las abejas obreras son genéticamente idénticas, ¿por qué son tan diferentes en forma y función? ¿Por qué casi todos los gatos de pelaje atigrado o abigarrado son hembras? ¿Cómo es que los humanos contienen billones de células en cientos de órganos complejos, y los gusanos microscópicos contienen aproximadamente unas mil células en solo unos cuantos órganos rudimentarios, pese a que humanos y gusanos tenemos el mismo número de genes?

Los científicos, tanto los que trabajan en el ámbito académico como los que lo hacen en el sector comercial, se están dando cuenta del enorme impacto que tiene la epigenética en la salud humana. Esto se ve en enfermedades como la esquizofrenia, la artritis reumatoide, el

cáncer o el dolor crónico. Existen ya dos tipos de fármacos que tratan con éxito determinados tipos de cáncer interfiriendo en los procesos epigenéticos. Las compañías farmacéuticas están invirtiendo centenares de millones de dólares en una carrera para desarrollar la próxima generación de fármacos epigenéticos para tratar algunas de las enfermedades más graves que afligen al mundo industrializado. Las terapias epigenéticas son la nueva frontera del descubrimiento de fármacos.

En biología, Darwin y Mendel llegaron a definir el siglo XIX como la era de la evolución y la genética; Watson y Crick definieron el siglo XX como la era del ADN y del entendimiento funcional de la interacción entre la genética y la evolución. Pero en el siglo XXI es la nueva disciplina científica de la epigenética la que está poniendo en cuestión muchas cosas que teníamos por dogmas y reconstruyéndolas de una forma infinitamente más variada, más compleja e incluso más hermosa.

El mundo de la epigenética es un mundo fascinante. Está lleno de sutileza y complejidad, y en los capítulos 3 y 4 nos sumergiremos a fondo en la biología molecular de lo que les sucede a nuestros genes cuando son epigenéticamente modificados. Pero como muchos de los conceptos verdaderamente revolucionarios en biología, la epigenética tiene en su base algunas cuestiones tan simples que parecen evidentes en cuanto se formulan. El capítulo 1 es el ejemplo más sencillo y a la vez importante de ello. Trata de la investigación con la que empezó la revolución epigenética.

Notas sobre nomenclatura

Existe una convención internacional sobre la forma en que se escriben los nombres de genes y proteínas, y es la que utilizamos en este libro.

Los nombres y los símbolos de los genes se escriben en cursiva. Los de las proteínas codificadas por los genes se escriben en letra redonda (texto normal).

Los símbolos de los genes y las proteínas humanos se escriben en caja alta (mayúsculas). Los de otras especies, como por ejemplo los ratones, se escriben en minúsculas con la primera letra en caja alta.

Esta convención se resume en la siguiente tabla correspondiente a un gen puramente hipotético.

	Humanos	Otras especies
Nombre del gen	*TAN SUMAMENTE COMPLICADO*	*Tan Sumamente complicado*
Símbolo del gen	*TSC*	*Tsc*
Nombre de la proteína	TAN SUMAMENTE COMPLICADO	Tan Sumamente Complicado
Símbolo de la proteína	TSC	Tsc

Como en todas las reglas, sin embargo, existen unas cuantas peculiaridades en ese sistema, y si bien esta convención es de aplicación general, en este libro encontraremos algunas excepciones.

1. Para estas y otras muchas citas, véase http://news.bbc.co.uk/1/hi/sci/tech/807126.stm
2. Un punto de partida útil para la descripción de los síntomas de la esquizofrenia, sus efectos sobre los pacientes y sus familias, y las estadísticas relevantes, es www.schizophrenia.com

Capítulo 1
Un sapo feo y un hombre elegante

Igual que el sapo, feo y ponzoñoso, luce en la frente una joya valiosa.
William Shakespeare

Un ser humano está compuesto de entre 50 y 70 billones de células, es decir, unos 50.000.000.000.000 de células. Este cálculo es algo impreciso, pero eso no tiene nada de sorprendente. Supongamos que fuera posible descomponer a una persona en sus células individuales y luego contarlas, al ritmo de una célula por segundo. Incluso en el caso de la estimación más baja se necesitaría un millón y medio de años para contarlas todas, y eso sin contar las pausas para tomar café o la posibilidad de descontarse en cualquier momento. Estas células forman una gama enorme de tejidos, todos ellos altamente especializados y completamente diferentes unos de otros. A menos que algo haya salido realmente mal, los riñones no crecen en nuestras cabezas, ni los dientes en nuestros globos oculares. Esto parece obvio, pero ¿por qué iba a serlo? En realidad es muy extraño, si recordamos que todas las células de nuestro cuerpo derivan de la división de tan solo una célula inicial. Esta célula inicial es el zigoto. Un zigoto se forma cuando un espermatozoide se fusiona con un óvulo. El zigoto se divide en dos células; estas a su vez se dividen en otras cuatro, dos cada una, y así sucesivamente, creando eventualmente esta milagrosa obra que es un cuerpo humano completo. Al dividirse, las células se van diferenciando progresivamente unas de otras formando tipos de células especializadas. Este proceso se conoce como diferenciación celular, y es un proceso vital en la formación de todos los organismos multicelulares.

Si observamos bacterias en un microscopio, casi todas las de una misma especie tienen un aspecto idéntico. Si observamos en cambio determinadas células humanas del mismo modo –digamos, por ejemplo, una célula del aparato digestivo y una neurona del cerebro– estaremos en apuros para afirmar que son siquiera de un mismo planeta. ¿Y qué? Bueno, el gran “que” es que estas dos células empezaron su vida exactamente con el mismo material genético. Y cuando digo exactamente quiero decir exactamente, como es lógico dado que ambas derivan de una misma célula inicial, el zigoto. Así que las dos células han llegado a ser completamente diferentes pese a proceder de una misma célula con un solo programa.

Una explicación de esto es que las células utilizan la misma información de maneras diferentes, y esto es efectivamente cierto. Pero no es esta una afirmación que nos haga avanzar mucho. En una adaptación del año 1960 de la obra de H.G.Wells *La máquina del tiempo*, protagonizada por Rod Taylor como el científico que viaja en el tiempo, hay una escena en la que este muestra su máquina del tiempo a unos colegas (todos ellos hombres, por supuesto) y uno de ellos le pide que explique cómo funciona la máquina. A continuación, nuestro héroe describe cómo viaja por el tiempo el tripulante de la máquina mediante el siguiente mecanismo:

> *Frente a él se encuentra la palanca que controla el movimiento. Desplazando la palanca hacia adelante la máquina avanza hacia el futuro. Desplazándola hacia atrás, retrocede hacia el pasado. Y cuanto mayor es la presión ejercida, más rápido viaja la máquina.*

Todos asienten sabiamente con la cabeza al oír esta explicación. El único problema es que no se trata de ninguna explicación, es solo una descripción. Y lo mismo vale de la afirmación según la cual las células utilizan la misma información de diferentes maneras: eso no explica realmente nada, solamente reformula de otro modo lo que ya sabíamos.

Lo realmente interesante es la exploración de cómo las células utilizan la misma información genética de diferentes maneras. Y aún más interesante es cómo recuerdan las células cómo lo hacen para seguir haciéndolo. Las células de nuestra médula ósea producen glóbulos rojos, las de nuestro hígado producen células hepáticas. ¿Por qué?

Una explicación posible y muy sugestiva es que a medida que las células se especializan reorganizan su material genético, posiblemente perdiendo genes que no necesitan. El hígado es un órgano vital sumamente complejo. La página web del British Liver Trust[1] afirma que el hígado realiza más de 500 funciones, incluido el procesamiento de los alimentos ya digeridos por nuestros intestinos, la neutralización de las toxinas y la creación de enzimas que llevan a cabo toda clase de tareas en nuestros cuerpos. Pero una cosa que el hígado simplemente no hace es transportar oxígeno por el cuerpo. Este trabajo lo realizan nuestros glóbulos rojos, que están llenos a rebosar de una proteína particular, la hemoglobina. La hemoglobina atrapa el oxígeno en aquellos tejidos en los que más abunda, como en los pulmones, y luego lo suelta cuando los glóbulos rojos llegan a un tejido que

necesita este elemento esencial para la vida, como los diminutos vasos sanguíneos de las puntas de los dedos de los pies. El hígado nunca tendrá que desempeñar esta función, y seguramente por ello se desprende del gen de la hemoglobina, que simplemente no va a necesitar.

Esta es una sugerencia perfectamente razonable –las células podrían simplemente perder el material genético que no van a tener que utilizar. Al diferenciarse, podrían deshacerse de cientos de genes que ya no van a necesitar. Podría seguramente darse una variación algo menos drástica de este proceso: tal vez las células simplemente desactivan los genes que no utilizan. Y tal vez lo hacen de un modo tan eficaz que estos genes ya no pueden volver a ser activados nunca más en esas células, es decir, son irreversiblemente desactivados. En los experimentos fundamentales que examinaron estas hipótesis sumamente razonables –la pérdida de genes o su desactivación irreversible– intervinieron un sapo feo y un hombre elegante.

Retrasando el reloj biológico

Este trabajo tiene su origen en unos experimentos llevados a cabo por John Gurdon en Inglaterra hace muchas décadas, primero en Oxford y posteriormente en Cambridge. Actualmente el profesor Sir John Gurdon sigue trabajando en su laboratorio en Cambridge, aunque ahora lo hace en un flamante edificio moderno que lleva su nombre. Gurdon es un hombre atractivo, modesto y simpático que, 40 años después de publicar sus pioneras investigaciones, sigue publicando trabajos en un campo esencialmente fundado por él mismo.

John Gurdon tiene un porte que resulta instantáneamente reconocible en Cambridge. A sus setenta años, es un hombre alto y delgado, con una maravillosa mata de pelo rubio peinado hacia atrás. Su aspecto es el del paradigmático gentleman inglés que aparece en muchas películas americanas, y como corresponde estudió en Eton. Cuentan una maravillosa anécdota según la cual John Gurdon aún conserva un informe escolar de su profesor de biología en aquella institución en la que puede leerse: “Tengo entendido que Gurdon piensa en ser científico. Tal como es ahora, esta es una idea ridícula”[2]. Este comentario de su maestro se basaba en la poca afición que tenía Gurdon por aprender de memoria hechos desconectados. Pero como veremos, para un científico tan bueno como John Gurdon, la memoria es mucho menos importante que la imaginación.

En 1937 el bioquímico húngaro Albert Szent-Gyorgyi obtuvo el

premio Nobel de Fisiología o Medicina, y entre sus logros se cuenta el descubrimiento de la vitamina C. En una frase que ha sido traducida de varias maneras sutilmente diferentes pero que tiene una sola interpretación, definió su descubrimiento de este modo: “He visto lo que todo el mundo había visto pero pensando lo que nadie había pensado”[3]. Es probablemente la mejor descripción que se ha hecho nunca de lo que hacen en realidad los grandes científicos. Y John Gurdon es verdaderamente un gran científico, que puede muy bien seguir los pasos de Szent-Gyorgy hacia el Nobel. El año 2009 obtuvo el Lasker Prize, que es al Nobel lo que los Globos de Oro son tantas veces a los Óscars de Hollywood. El trabajo de John Gurdon es tan maravilloso que cuando uno lo describe por vez primera parece tan obvio como si cualquiera pudiera hacerlo. Las preguntas que se formuló y la forma en que las respondió tienen esa característica tan típicamente científica de ser tan elegantes que parecen obviedades.

John Gurdon utilizó en su trabajo huevos de sapo no fertilizados. Cualquiera que haya tenido alguna vez una pecera con huevos de rana y que haya observado cómo esa gelatinosa masa se convertía en un montón de pequeños renacuajos primero, y de ranitas después, ha estado trabajando, sea consciente de ello o no, con huevos fertilizados, es decir, huevos en los que ha entrado esperma, con lo que se ha creado un núcleo completo nuevo. Los huevos con los que trabajó John Gurdon eran muy parecidos, pero no habían entrado en contacto con ningún espermatozoide. Gurdon tenía buenos motivos para elegir huevos de sapo en sus experimentos. Los huevos de anfibio son generalmente grandes, abundantes y transparentes. Estas características hacen de los anfibios unas especies experimentalmente muy útiles, pues sus huevos son relativamente fáciles de manejar. Mucho más, por supuesto, que un óvulo humano, que es difícil de obtener, frágil, opaco y tan pequeño que hay que emplear un microscopio para verlo. John Gurdon trabajó con el sapo africano con garras (Xenopus laevis, para utilizar su nombre oficial), uno de estos animales a la vez feos y hermosos, como John Malkovich, e investigó qué pasaba con las células a medida que se iban desarrollando y diferenciando. Quería comprobar si las células epiteliales de un sapo adulto todavía contenían todo el material genético con el que habían empezado su desarrollo, o si había perdido o desactivado algunas de ellas de modo irreversible a medida que se iban especializando. Para ello extrajo el núcleo de una célula de un sapo adulto y lo insertó en un huevo no fertilizado cuyo núcleo había extraído previamente. Esta técnica se conoce como transferencia nuclear de células somáticas (TNCS) y la citaremos muchas veces. “Somático” viene de la palabra griega que significa “cuerpo”.

Tras realizar la TNCS, John Gurdon puso los huevos de sapo en un

entorno apropiado (muy parecido a la pecera de huevos de rana de un niño) y esperó a ver si de alguno de ellos salía algún renacuajo.

Los experimentos fueron diseñados para verificar la siguiente hipótesis: "A medida que las células se van especializando (diferenciando) sufren una pérdida/desactivación irreversible de su material genético". Había dos resultados posibles de los experimentos:

Este

La hipótesis era correcta y el núcleo "adulto" había perdido parte de las instrucciones originales necesarias para crear un nuevo individuo. En estas circunstancias, un núcleo adulto nunca podrá reemplazar al núcleo de un huevo y producir de este modo un nuevo sapo sano, con todos sus variados y especializados tejidos.

O este otro

La hipótesis era incorrecta, y era posible crear nuevos sapos retirando el núcleo de un huevo y sustituyéndolo por el de una célula de un tejido de un sapo adulto.

Otros investigadores habían empezado a trabajar en ello antes de que John Gurdon decidiese abordar el problema: dos científicos llamados Briggs y King, utilizando otra especie de anfibio, el anuro Rana pipiens. En 1952 transplantaron los núcleos de unas células en una fase muy temprana de su desarrollo y los implantaron en un huevo al que habían extraído su núcleo original, y obtuvieron ranas viables. De este modo demostraron que era técnicamente posible transferir un núcleo de otra célula a un huevo "vacío" sin matar a la célula. Sin embargo, Briggs y King publicaron más tarde un segundo trabajo describiendo un experimento en el que habían utilizado el mismo sistema pero transfiriendo un núcelo de una célula de un tejido más desarrollado, y esta vez no obtuvieron ninguna rana. La diferencia en las células utilizadas para implantar los núcleos en los dos estudios era absolutamente insignificante: un solo día de diferencia y no nacía ninguna ranita. Esto sustentaba la hipótesis de que se producía algún tipo de desactivación irreversible a medida que se diferenciaban las células. Un científico menos riguroso que John Gurdon se habría visto disuadido por ello. Pero él siguió trabajando en el problema durante más de una década.

El diseño de los experimentos era fundamental. Supongamos que hemos empezado a leer las novelas policiales de Agatha Christie. Tras leer tres o cuatro de ellas formulamos la siguiente hipótesis: "En las novelas de Agatha Christie el asesino es siempre el médico". Leemos otras tres y comprobamos que en cada una de ellas el asesino es efectivamente el médico. ¿Hemos probado nuestra hipótesis? No. Siempre podemos pensar que tendríamos que leer otra de sus novelas para estar seguros. ¿Y si hubiera algunas que fuesen imposible de

conseguir o que ya no se editasen? Por muchas que leyéramos nunca podríamos estar seguros de haberlas leído todas. Pero esta es la gracia de refutar una hipótesis. Bastaría con encontrar un caso en el que Poirot o Miss Marple revelasen que el médico era un hombre de una gran probidad y que el asesino era en realidad el mayordomo o el párroco para que nuestra hipótesis quedase hecha trizas. Y así es como se diseñan los mejores experimentos científicos –para falsar o refutar una idea, no para probarla.

Y esta fue la genialidad del trabajo de John Gurdon. Cuando realizó sus experimentos lo que intentaba era un auténtico desafío para la tecnología de la época. Si no conseguía producir sapos a partir de núcleos adultos significaría simplemente que su técnica tenía algún fallo. Por muchas veces que repitiera el experimento sin obtener sapos, no por ello habría probado la hipótesis. Pero si conseguía producir sapos vivos a partir de huevos en los que el núcleo original había sido reemplazado por un núcleo adulto, habría refutado la hipótesis. Habría demostrado más allá de toda duda que cuando las células se diferencian, su material genético no se pierde ni cambia de un modo irreversible. La gracia de este enfoque era que un solo sapo podía derribar toda la teoría –y eso fue lo que pasó.

John Gurdon es increíblemente generoso en su reconocimiento de la naturaleza colegiada de la investigación científica y de los beneficios que ha obtenido trabajando en laboratorios y universidades dinámicos. Tuvo la suerte de empezar su trabajo en un laboratorio bien equipado que disponía de un instrumento capaz de producir luz ultravioleta. Esto le permitió eliminar los núcleos originales de las células receptoras sin provocar demasiados daños en ellas, y también "ablandar" las células para poder utilizar unas diminutas agujas hipodérmicas de vidrio para inyectar en ellas los nuevos núcleos. Otros científicos del mismo laboratorio, en un trabajo de investigación independiente, habían desarrollado una cepa de sapos con una mutación fácilmente detectable y no perjudicial. Como casi todas las mutaciones, esta estaba en el núcleo, no en el citoplasma. El citoplasma es el líquido espeso que contienen las células en su interior y en el que flota el núcleo.

John Gurdon utilizó huevos de una cepa de sapos y núcleos de la cepa mutante. De este modo podía mostrar sin ningún género de dudas que cualquier sapo que obtuviese habría sido codificado por los núcleos inyectados y que no era simplemente el resultado de un error experimental, como podía haber sucedido si hubiesen quedado unos cuantos núcleos en las células receptoras después del tratamiento para su extirpación. John Gurdon tardó unos quince años, empezando a finales de los años cincuenta del siglo XX, en demostrar que de hecho núcleos de células especializadas pueden crear animales completos si

se colocan en el entorno adecuado, es decir, en un huevo no fertilizado[4]. Cuanto más diferenciada /especializada es la célula donante del núcleo, menos exitoso es el proceso por lo que respecta al número de animales obtenidos, pero esta es la belleza de la refutación de una hipótesis –podemos empezar con un montón de huevos de sapo pero no tenemos que acabar con muchos sapos vivos para validar nuestro argumento. Con un solo médico que no sea un asesino basta, ¿recuerdan?

John Gurdon demostró que aunque hay algo en las células que puede hacer que determinados genes se expresen o no en diferentes tipos de células, sea lo que sea este algo, no se desactiva de modo permanente ni desaparece del material genético, porque poniendo un núcleo adulto en el entorno adecuado –en este caso en un huevo "vacío" no fertilizado– perdía la memoria del tipo de célula de la que procedía. Volvía a ser un núcleo ingenuo de un embrión y empezaba de nuevo todo el proceso de desarrollo.

La epigenética es ese "algo" que contienen las células. El sistema epigenético controla cómo se utilizan los genes del ADN, en algunos casos durante cientos de ciclos de división celular, y los efectos se heredan cuando las células se dividen. Las modificaciones epigenéticas del programa esencial se producen independientemente del código genético, se sobreponen al mismo y programan a las células durante décadas. Pero en las circunstancias adecuadas esta capa de información epigenética puede ser eliminada para dejar al descubierto la misma flamante secuencia de ADN que siempre ha estado ahí. Esto fue lo que sucedió cuando Gurdon inyectó los núcleos de unas células plenamente diferenciadas en el interior de unos óvulos no fertilizados.

¿Era conocedor John Gurdon de este proceso cuando produjo sus primeras crías de sapo? No. ¿Resta ello importancia a su espléndido hallazgo? En absoluto. Darwin no sabía de la existencia de los genes cuando desarrolló su teoría de la evolución por selección natural. Mendel no sabía nada del ADN cuando, en el jardín de un monasterio austriaco, desarrolló su idea de la existencia de factores hereditarios "puros" en los guisantes que cultivaba y que se transmitían de generación en generación. Pero no importa. Todos ellos vieron lo que nadie había visto hasta entonces y de repente todos pudimos ver el mundo de una nueva manera.

El paisaje epigenético

Curiosamente, cuando John Gurdon llevó a cabo sus experimentos existía ya un marco conceptual para acogerlos. Si asisten a una

conferencia que tenga la palabra “epigenética” en el título, pueden estar seguros de que en algún momento el conferenciante se referirá a una cosa llamada “el paisaje epigenético de Waddington” y les mostrará la granulada imagen que pueden ver en la figura 1.1.

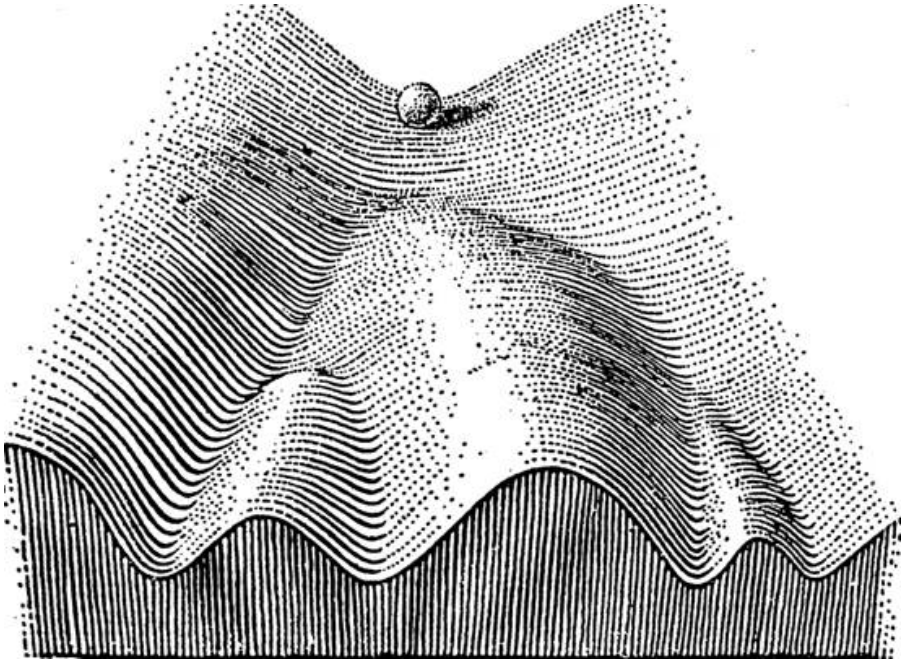

Figura 1.1: Imagen creada por Conrad Waddington para representar el paisaje epigenético. La posición de la bola representa los diferentes destinos de la célula

Conrad Waddington fue un erudito británico enormemente influyente. Había nacido en la India en 1903 pero fue enviado de vuelta a Inglaterra para asistir a la escuela. Estudió en la Universidad de Cambridge pero hizo la mayor parte de su carrera en la Universidad de Edimburgo. Sus intereses académicos abarcaban desde la biología del desarrollo a las artes visuales pasando por la filosofía, y la interfertilización entre esas diferentes áreas resulta evidente en las nuevas formas de pensar de las que Waddington fue un pionero.

Waddington presentó su metafórico paisaje epigenético en 1957 para ejemplificar una serie de conceptos de la biología del desarrollo[5]. Este paisaje merece que le dediquemos un poco de atención. Como puede verse, hay una bola en lo alto de una colina. Si la bola rueda colina abajo puede pasar por uno o varios valles. Visualmente, esto nos sugiere varias cosas, porque de niños todos hemos hecho rodar bolas por alguna pendiente o escalera.

¿Qué es lo primero que vemos cuando observamos la imagen del paisaje de Waddington? Sabemos que una vez que la bola ha llegado al pie de la colina es probable que se quede quieta allí a menos que hagamos algo con ella. Sabemos que devolver la bola a lo alto de la colina será más difícil de lo que ha sido hacerla rodar colina abajo. También sabemos que sería difícil hacer desviar la bola de un valle a otro. Sería incluso más fácil hacer retroceder a la bola parte del camino ya recorrido y desviarla entonces de valle que hacerla pasar

directamente de un valle a otro. Esto es especialmente cierto si los dos valles en cuestión están separados por más de un montículo.

Esta imagen es increíblemente poderosa a la hora de ayudarnos a visualizar lo que puede estar sucediendo durante el desarrollo celular. La bola en lo alto de la colina es el zigoto, la célula individual resultante de la fusión de un huevo y un espermatozoide. Cuando las diversas células del cuerpo empiezan a diferenciarse (y a volverse más especializadas), cada una de ellas es como una bola que ha rodado colina abajo encaminándose a uno u otro valle. Una vez que ha recorrido todo el camino que puede recorrer se quedará quieta. A menos que suceda algo extraordinariamente espectacular, esta célula no volverá nunca a convertirse en una célula de otro tipo (no podrá saltar a otro valle). Tampoco podrá volver a lo alto de la colina y rodar de nuevo colina abajo para dar lugar a toda clase de diferentes tipos de célula.

Del mismo modo que las palancas de la máquina del tiempo, al principio el paisaje de Waddington parece solo otra descripción. Pero es algo más que eso; es un modelo que nos ayuda a desarrollar formas de pensar. Igual que tantos de los científicos que aparecen en este capítulo, Waddington no conocía los detalles del mecanismo, pero esto no es realmente importante. Lo que él hizo fue regalarnos una forma muy útil de pensar en el problema.

Los experimentos de John Gurdon habían demostrado que a veces, empleándose a fondo, podía mover una célula desde el fondo de un valle al pie de la colina haciéndola retroceder hasta la parte superior de la misma. Desde allí podía dejarla rodar otra vez colina abajo y convertirse una vez más en otro tipo de célula. Y cada sapo que John Gurdon y su equipo lograron producir nos enseñó otras dos cosas muy importantes. La primera fue que la clonación –la recreación de un animal a partir de una célula de un animal adulto– es posible, porque esto es lo que habían conseguido. Y la segunda fue enseñarnos que la clonación es realmente difícil, porque tuvieron que llevar a cabo cientos de TNCS por cada sapo que lograron producir.

Por eso causó sensación que en 1966 Keith Campbell e Ian Wilmut, dos científicos del Instituto Roslin, crearan el primer clon de un mamífero, la oveja Dolly[6]. Lo lograron utilizando la técnica de la TNCS, igual que John Gurdon. En el caso de Dolly, los científicos transfirieron el núcleo de una célula de la glándula mamaria de una oveja adulta a un óvulo de oveja no fertilizado del que se había extraído el núcleo original. Luego implantaron este óvulo en el útero de una oveja receptora. Los pioneros de la clonación fueron obsesivamente persistentes. Campbell y Wilmut llevaron a cabo casi 300 transferencias nucleares antes de obtener ese animal icónico que ahora puede contemplarse en una vitrina giratoria del Royal Scottish

Museum de Edimburgo. Incluso hoy, cuando se han clonado todo tipo de animales, desde caballos de carreras hasta reses, e incluso perros y gatos, el proceso es increíblemente poco eficiente. Dos cuestiones han seguido siendo notablemente pertinentes desde que Dolly empezó a caminar trastabillando por las páginas de la historia sobre unas patas que pronto se verían prematuramente aquejadas de artritis. La primera es: ¿por qué es tan poco eficiente la clonación animal? Y la segunda: ¿por qué los animales clonados a menudo son menos sanos que las crías "naturales"? La respuesta, en ambos casos, es la epigenética, y las explicaciones moleculares serán evidentes a medida que avancemos en nuestra exploración del terreno. Pero antes vamos a seguir el ejemplo del viajero en el tiempo de H. G. Wells y presionaremos la palanca para avanzar unos treinta años, desde el laboratorio de John Gurdon en Cambridge a otro laboratorio en Japón donde un científico igualmente obsesivo ha encontrado una forma completamente nueva de clonar animales a partir de células adultas.

1. http://www.britishlivertrust.org.uk/home/the-liver.aspx
2. http://www.wellcome.ac.uk/News/2010/Features/WTX063605.htm
3. Citado en The Scientist Speculates, ed. Good, I.J. (1962), publicado por Heinemann.
4. Entre los documentos clave de este programa de trabajo destacan: Gurdon et al. (1958), Nature 182: 64-5; Gurdon (1960), J Embryol Exp Morphol. 8: 505-26; Gurdon (1962), J Hered. 53: 5-9; Gurdon (1962), Dev Biol. 4: 256-73; Gurdon (1962), J Embryol Exp Morphol. 10: 622-40.
5. Waddington, C.H. (1957), The Strategy of the Genes, publicada por Geo Allen & Unwin.
6. Campbell et al. (1996), Nature 380: 64-6.

Capítulo 2
Cómo aprendimos a rodar cuesta arriba

Cualquier tipo mínimamente inteligente puede hacer cosas mejores y más complejas…
Se necesita un toque de genio y mucho coraje para avanzar en la dirección opuesta.
Albert Einstein

Situémonos a unos 40 años de distancia del trabajo de John Gurdon y a una década de la oveja Dolly. El tema de la clonación de mamíferos ha tenido una cobertura tan amplia en la prensa que podría pensarse que se ha convertido en un procedimiento fácil y rutinario. La realidad es que sigue siendo muy laborioso y que lleva mucho tiempo crear clones por transferencia nuclear, y por consiguiente es un proceso generalmente muy costoso. Buena parte del problema reside en el hecho de que el proceso consiste en la implantación manual de núcleos somáticos a los óvulos. A diferencia de los anfibios con los que trabajaba John Gurdon, en ese caso se da el problema adicional de que los mamíferos no producen muchos óvulos a la vez. Los óvulos de los mamíferos han de ser extraídos cuidadosamente del cuerpo, no basta con echarlos a un tanque como los huevos de sapo. Los óvulos de mamífero han de ser cultivados con una delicadeza increíble para mantenerlos vivos y sanos. Los investigadores tienen que extraer manualmente el núcleo de un óvulo, inyectarlo en el núcleo de una célula adulta (sin causar ningún daño) y luego cultivar las células de un modo muy, muy cuidadoso antes de poder implantarlas en el útero de otra hembra. Este es un trabajo increíblemente intensivo y minucioso y solo puede hacerse con una célula cada vez.

Durante años los científicos han soñado en cómo sería la clonación en un mundo ideal. Tomarían células realmente accesibles del mamífero adulto que quisieran clonar. Una pequeña muestra de células procedentes de un raspado en la piel serían una opción buena y fácil. Luego tratarían estas células en el laboratorio, añadiéndoles genes específicos, o proteínas o diversas sustancias químicas. Este tratamiento cambiaría la forma en que se comportarían los núcleos de dichas células. En vez de actuar como el núcleo de una célula epitelial, actuarían del mismo modo que los núcleos de los óvulos recién fertilizados. Este tratamiento tendría en definitiva el mismo efecto que la transferencia de núcleos desde células adultas a óvulos fertilizados a

los que se habría extraído su propio núcleo. La belleza de este hipotético plan es que se evitaría la mayor parte de los pasos más difíciles y exigentes que requiere un nivel tan elevado de pericia técnica en la manipulación de unas células diminutas. Esto la convertiría en una técnica fácilmente accesible y que podría llevarse a cabo con montones de células simultáneamente y no con una sola transferencia nuclear cada vez.

Vale, todavía tendríamos que encontrar la forma de ponerlas en una madre de alquiler, pero solo hemos de recorrer toda la ruta de la madre de alquiler si lo que queremos es producir un individuo completo. A veces esto es exactamente lo que queremos: recrear un toro de lidia o un valioso semental, por ejemplo, pero no es lo que la mayoría de personas en su sano juicio querrían hacer con un ser humano. De hecho la clonación de humanos (la clonación reproductiva) está prohibida en casi todos los países que disponen de los científicos y de la infraestructura necesaria para llevar a cabo esta tarea. Pero en realidad, y por diversos motivos, no tenemos ninguna necesidad de ir tan lejos como esto para que la clonación tenga una utilidad para la humanidad. Lo que necesitamos son células que tengan el potencial para convertirse en montones de otros tipos de célula. Estas son las células que se conocen como células madre o troncales, y que, metafóricamente, se encuentran cerca de la parte superior del paisaje epigenético de Waddington. La razón de que necesitemos dichas células reside en la naturaleza de las enfermedades que son más problemáticas en el mundo desarrollado.

En las partes ricas de nuestro planeta las enfermedades que matan a más gente son crónicas. Tardan mucho tiempo en desarrollarse y a menudo tardan también mucho tiempo en matarnos cuando lo hacen. Tomemos las enfermedades coronarias, por ejemplo. Si alguien sobrevive a un ataque de corazón no tiene siempre que volver a tener de nuevo un corazón totalmente sano. Durante el ataque algunas de las células del miocardio o músculo cardíaco (cardiomiocitos) pueden verse privadas de oxígeno y morir. Podríamos pensar que esto no sería ningún problema siempre que el corazón fuese capaz de crear células de repuesto. Al fin y al cabo, si donamos sangre, nuestra médula ósea puede producir más glóbulos rojos. De modo similar, tenemos que causar mucho daño al hígado para que este no sea capaz de regenerarse y autorrepararse. Pero el corazón es diferente. Los cardiomiocitos son células “terminalmente diferenciadas”, es decir, que han llegado al pie de la colina en el paisaje de Waddington y que se han quedado quietas en un determinado valle o depresión. A diferencia de la médula ósea o del hígado, el corazón no dispone de un depósito accesible de células menos especializadas (células troncales cardíacas) que puedan convertirse en nuevos cardiomiocitos.

Por tanto, el problema a largo plazo que sigue a un ataque de miocardio es que nuestros cuerpos no pueden producir nuevas células del músculo cardíaco. El cuerpo hace lo único que puede hacer y sustituye los cardiomiocitos muertos por tejido conectivo, y el corazón ya no vuelve a latir del mismo modo que antes del ataque.

Algo parecido sucede en otras enfermedades: las células productoras de insulina que se pierden cuando los adolescentes desarrollan diabetes del tipo 1; las células cerebrales que se pierden en la enfermedad de Alzheimer; las células productoras de cartílagos que desaparecen durante la osteoartritis; la lista sería muy larga. Sería magnífico que pudiéramos reemplazar todas estas células por otras células nuevas idénticas a las nuestras. De este modo no tendríamos que hacer frente ni al problema del rechazo que hace tan complicado el trasplante de órganos ni a la falta de donantes compatibles. La utilización de células madre en este sentido se conoce como clonación terapéutica; es la creación de células idénticas a las de un individuo concreto para tratar una enfermedad.

Hace más de cuarenta años que sabemos que esto es teóricamente posible. El trabajo de John Gurdon y de otros científicos posteriores mostró que las células adultas contienen los programas de todas las células del cuerpo siempre que podamos encontrar la forma correcta de acceder a ellos. John Gurdon había extraído núcleos de células de sapos adultos, los había implantado en óvulos de sapo y había podido hacer que todos estos núcleos remontasen el paisaje de Waddington hasta el principio para crear nuevos animales. Los núcleos adultos –y esta es la palabra clave– habían sido reprogramados. Ian Wilmut y Keith Campbell habían hecho algo muy parecido con ovejas. La característica importante a destacar aquí es que en cada caso la reprogramación solo funcionaba cuando el núcleo adulto se implantaba en un óvulo no fertilizado. Lo importante era el óvulo. No es posible clonar a un animal cogiendo un núcleo adulto e implantándolo en otro tipo de célula.

¿Por qué no es posible?

Necesitamos unas nociones de biología aquí. El núcleo contiene la mayor parte del ADN/genes que nos codifica –nuestro cianotipo o programa. Hay una minúscula fracción del ADN que no está en el núcleo, sino en unas diminutas estructuras llamadas mitocondrios, pero vamos a prescindir de ello aquí. Cuando nos hablan por vez primera de células en la escuela es casi como si el núcleo fuese todopoderoso y el resto de la célula –el citoplasma– fuese solo una bolsa de líquido sin demasiada importancia. Nada dista más de la verdad, y este es especialmente el caso del óvulo, porque los sapos y la oveja Dolly nos han enseñado que el citoplasma del óvulo tiene una importancia fundamental. Algún factor –o factores– en el citoplasma

del óvulo es lo que reprogramó a las células adultas que los investigadores habían introducido en él. Estos factores desconocidos llevaron al núcleo desde el fondo de uno de los valles de Waddington directamente hasta lo alto del paisaje.

Nadie entiende realmente cómo consigue el citoplasma de un óvulo convertir unos núcleos adultos en núcleos como los de un zigoto. Se daba generalmente por supuesto que fuese cual fuese la causa tenía que ser increíblemente complicada y difícil de desentrañar. A menudo en la ciencia las grandes preguntas contienen en su interior otras cuestiones más pequeñas y manejables. Así pues, varios laboratorios se dispusieron a abordar un problema conceptualmente más simple, aunque técnicamente también muy complejo.

Un potencial infinito

Recuerden la bola que estaba en lo alto de la colina en el paisaje de Waddington. En términos celulares es el zigoto y nos referimos a este tipo de célula como totipotente, es decir, que tiene el potencial de formar cualquiera de las células corporales, incluidas las de la placenta. Por supuesto, por definición los zigotos son bastante escasos en número y la mayor parte de científicos que trabajan en las primerísimas etapas del desarrollo utilizan células de una etapa algo posterior, las famosas células troncales embrionarias [ES cells o embryonic stem cells]. Estas células se crean como resultado de unos senderos normales del desarrollo. El zigoto se divide varias veces para crear un paquete de células llamado blastocisto. Aunque típicamente el blastocisto tiene menos de 150 células, ya es un embrión temprano con dos compartimentos distintos. Hay una capa exterior llamada trofectodermo, que finalmente formará la placenta y otros tejidos extra-embrionarios, y una masa celular interior [ICM, inner cell mass].

La figura 2.1 muestra el aspecto que tiene el blastocisto. El dibujo es en dos dimensiones, pero en realidad el blastocisto es una estructura tridimensional, de modo que su forma real es la de una pelota de tenis con una pelota de golf pegada en su interior.

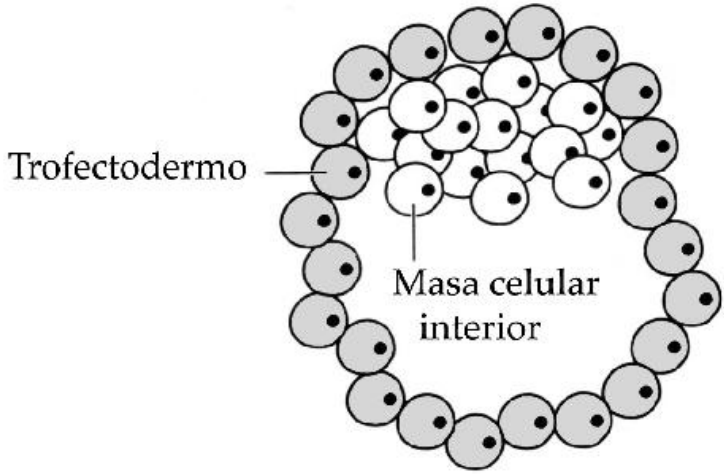

Figura 2.1: Diagrama de un blastocisto mamífero. Las células del trofectodermo originarán la placenta. Durante el desarrollo normal, las células de la masa celular interior (ICM) originarán los tejidos del embrión. En las condiciones controladas del laboratorio, las células de la ICM pueden cultivarse como células troncales embriónicas pluripotentes.

Las células de la ICM pueden cultivarse en el laboratorio en una placa de Petri. Son difíciles de mantener y requieren unas condiciones de cultivo especiales y un manejo meticuloso, pero si se hacen las cosas bien la recompensa que se obtiene es que se dividen un número ilimitado de veces permaneciendo iguales a la célula padre. Son las células ES y como su nombre completo sugiere pueden formar cualquier célula del embrión y a la larga del animal maduro. No son totipotentes; no pueden formar células placentarias; se las llama pluripotentes, porque pueden hacer casi cualquier otro tipo de célula.

Estas células ES han sido muy valiosas para entender qué es importante para mantener a las células en un estado pluripotente. A lo largo de los años varios destacados científicos, como Azim Surani en Cambridge, Austin Smith en Edimburgo, Rudolf Jaenisch en Boston y Shinya Yamanaka en Kioto han dedicado cantidades enormes de tiempo a identificar los genes y las proteínas expresados (activados) en las células ES. Concretamente trataron de identificar los genes que mantienen a las células ES en un estado pluripotente. Estos genes son extraordinariamente importantes porque cuando las células ES están en cultivo parecen ser muy propensas a convertirse en otros tipos de células si no se mantienen exactamente las condiciones adecuadas. Un pequeño cambio en las condiciones, por ejemplo, y una placa de Petri con un cultivo de células originariamente ES puede diferenciarse en cardiomiocitos y hacer lo que mejor hacen las células coronarias: latir sincronizadamente unas con otras. Un cambio ligeramente diferente

en las condiciones –una alteración en el delicado equilibrio de sustancias químicas en el cultivo, por ejemplo, puede apartar a las células ES de la ruta cardíaca e iniciar el desarrollo de las células que dan origen a las neuronas de nuestros cerebros.

Los científicos que trabajaban con células ES identificaron un montón de genes que eran importantes para mantener la pluripotencia de las células. Las funciones de los diferentes genes que identificaron no eran necesariamente idénticas. Algunas eran muy importantes para la auto-renovación, es decir, para que una célula ES se dividiera formando dos células ES, mientras que otras eran necesarias para evitar que las células se diferenciasen[1].

Así pues, a comienzos del siglo XXI los científicos habían encontrado una forma de mantener células ES pluripotentes en placas de Petri y conocían bastante bien su biología. También habían aprendido a alterar las condiciones del cultivo para que las células ES se diferenciasen en diversos tipos de células: hepáticas, coronarias, neuronas, etc. Pero ¿en qué medida contribuye esto a hacer realidad el sueño al que nos hemos referido antes? ¿Podían los laboratorios utilizar esta información para crear nuevas formas de hacer retroceder a las células y hacerlas remontar hasta lo alto del paisaje de Waddington? ¿Sería posible tomar una célula completamente diferenciada y tratarla en el laboratorio para que se convirtiera en una célula ES, con todo el potencial que ello implica? Si bien los científicos tenían buenos motivos para creer que esto era teóricamente posible, una cosa es la teoría y otra la práctica. Pero era un proyecto maravillosamente tentador para los científicos interesados en utilizar células madre para tratar enfermedades humanas.

A mediados de la primera década del siglo actual se habían identificado más de veinte genes que parecían tener una importancia fundamental para las células ES. No estaba necesariamente claro cómo colaboraban estas y había motivos para pensar que todavía quedaba mucho por conocer respecto a la biología de las células ES. Se daba por supuesto que sería casi inconcebiblemente difícil coger una célula madura y recrear esencialmente las condiciones intracelulares sumamente complejas que se encuentran en una célula ES.

El triunfo del optimismo

A veces los mayores avances científicos se producen porque alguien hace caso omiso del pesimismo imperante. En este caso, el optimista que decidió poner a prueba lo que todo el mundo suponía que era imposible fue el anteriormente mencionado Shinya Yamanaka, con su investigador postdoctoral ayudante Kazutoshi Takahashi.

El profesor Yamanaka es una de las más jóvenes lumbreras en el campo de las células madre y la pluripotencia celular. Nació en Osaka a comienzos de los años sesenta y de un modo que no es nada habitual

ha ocupado con mucho éxito cargos académicos en instituciones de alto nivel tanto en Japón como en Estados Unidos. Originalmente se formó como médico y se especializó como cirujano ortopédico. Los especialistas en esta disciplina son a menudo menospreciados por otros cirujanos como "a brigada del martillo y el cincel". Es injusto, pero lo cierto es que la práctica quirúrgica ortopédica está tan alejada de la elegancia de la biología molecular como sea posible imaginar.

Probablemente más que ninguno de los investigadores que trabajan en el campo de las células madre, el profesor Yamanaka se ha visto movido por el deseo de encontrar una forma de crear células pluripotentes a partir de células diferenciadas en el laboratorio. Empezó esta fase de su trabajo con una lista de 24 genes que eran vitalmente importantes en las células ES. Eran todos los genes "pluripotenciales", los que tienen que activarse para que las células ES sigan siendo pluripotentes. Si se utilizan diversas técnicas experimentales para desactivar a estos genes, las células ES empiezan a diferenciarse igual que las células coronarias de la placa de Petri a las que hemos hecho referencia antes, y ya nunca vuelven a ser células ES. De hecho, esto es lo que sucede en parte naturalmente durante el desarrollo de un mamífero cuando las células se diferencian y se especializan –desactivan a esos genes pluripotenciales.

Shinya Yamanaka decidió comprobar si diversas combinaciones de estos genes podían devolver las células diferenciadas a una fase anterior de desarrollo. Era una posibilidad muy remota y además implicaba la dificultad de que si los resultados eran negativos, es decir, si ninguna de las células "retrocedía" a una fase anterior de su desarrollo, no sería posible saber si ello se debería a que no era posible que lo hicieran o a que simplemente no se habían preparado las condiciones experimentales adecuadas. Era un riesgo para un científico prestigioso como Yamanaka, y, teniendo en cuenta la forma en que se establece el escalafón de las carreras científicas, era un reto aún mayor para Takahashi, su joven colaborador en los experimentos.

Dicen que amenazado con que se hicieran públicas unas cartas de amor que le comprometían, el duque de Wellington exclamó: "Publicadlas e iros al carajo." En el caso de los científicos, el mantra es casi el mismo, solo que con un pequeño matiz especial. En nuestro caso es "Publicas o te vas al carajo" –si no publicas tus trabajos de investigación no consigues becas para investigar ni cargos académicos. Y es realmente muy raro conseguir publicar un artículo en una de las mejores revistas especializadas si el mensaje que resume tus muchos años de investigación de un problema se reduce a: "Lo he intentado de una y mil maneras, pero la cosa no ha funcionado." De modo que embarcarse en un proyecto que tiene relativamente pocas posibilidades de acabar en un resultado positivo representa una gran

confianza que demuestra el coraje de estos dos científicos, particularmente el de Takahashi.

Yamanaka y Takahashi seleccionaron sus 24 genes y decidieron ponerlos a prueba en un tipo de célula conocido como MEF [mouse embryonic fibroblasts o fibroblastos embrionarios de ratón]. Los fibroblastos son las células principales del tejido conectivo o conjuntivo y se encuentran en toda clase de órganos, incluida la piel. Son realmente fáciles de extraer y crecen fácilmente en cultivos, por lo que son una gran fuente de células para hacer experimentos. Dado que los MEF proceden de embriones, se esperaba que, en las condiciones adecuadas, retuviesen en parte la capacidad de revertir a tipos de célula más tempranos.

¿Recuerdan que John Gurdon utilizaba cepas de sapos donantes y receptores que tenían diferentes marcadores genéticamente codificados para poder distinguir qué núcleos eran los que habían generado a los nuevos animales? Pues Yamanaka hizo algo parecido. Utilizó células de ratones con un gen extra añadido, el gen de la resistencia a la neomicina (neo^R), y lo que hace exactamente este gen es lo que su nombre indica. La neomicina es un compuesto antibiótico que normalmente mata las células de los mamíferos. Pero si las células han sido genéticamente manipuladas para expresar el gen de la resistencia a la neomicina, pueden sobrevivir. Cuando Yamanaka creó los ratones que necesitaba para sus experimentos les insertó el gen neo^R de una forma particular. Esto significaba que el gen neo^R solamente se activaba si la célula en la que estaba se había vuelto pluripotente. La célula tenía que comportarse como una célula ES. Así pues, si sus experimentos para hacer retroceder artificialmente a los fibroblastos hacia el estado de células ES indiferenciadas tenían éxito, las células seguirían creciendo, aunque se les administrase una dosis letal del antibiótico. Si los experimentos no tenían éxito, todas las células morirían.

El profesor Yamanaka y el doctor Takahashi insertaron los 24 genes que querían comprobar en unas moléculas especialmente diseñadas llamadas vectores. Estos vectores son como caballos de Troya que transportan altas concentraciones del ADN “extra” hacia los fibroblastos. Una vez en la célula, los genes eran activados y producían sus proteínas específicas. Estos vectores puede introducirse de un modo relativamente fácil en un gran número de células a la vez utilizando tratamientos químicos o pulsos eléctricos (Yamanaka no tuvo que recurrir a las ciertamente engorrosas microinyecciones). Cuando Yamanaka utilizó simultáneamente los 24 genes, algunas de las células sobrevivieron al tratamiento con la neomicina. Fue solo una pequeña fracción de las células, pero fue igualmente un resultado alentador. Significaba que estas células habían activado el gen neo^R.

Esto implicaba que se estaban comportando como células ES. Pero si utilizaba las células individualmente, ninguna de ellas sobrevivía. Luego Yamanaka y Takahashi añadieron varios grupos de 23 genes a las células. Utilizaron los resultados de estos experimentos para identificar diez genes que eran realmente fundamentales para crear las células pluripotentes resistentes a la neomicina. Haciendo pruebas con diversas combinaciones de estos diez genes dieron finalmente con el menor número de genes que podían actuar en comandita para convertir a los fibroblastos embrionarios en células tipo ES.

El número mágico resultó ser el cuatro. Cuando los fibroblastos eran invadidos por vectores que transportaban unos genes llamados *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* y *c-Myc* sucedía algo realmente extraordinario. Las células sobrevivían en la neomicina, mostrando que habían activado el gen neo^R y que eran, por tanto, como células ES. Y no solo eso, sino que los fibroblastos empezaron a cambiar de forma para parecer células ES. Utilizando diversos sistemas experimentales, los investigadores consiguieron convertir estas células reprogramadas en los tres principales tipos de tejido de los que están formados todos los órganos corporales de los mamíferos –ectodermo, mesodermo y endodermo. Las células ES normales también pueden hacer esto. Los fibroblastos no. Shinya Yamanaka mostró luego que podía repetir todo el proceso utilizando fibroblastos de ratones adultos en vez de embriones como material de trabajo. Esto puso de manifiesto que su método no dependía de ningún rasgo especial de las células embrionarias, sino que podía aplicarse a células de organismos maduros completamente diferenciados.

Yamanaka llamó a las células que había creado "células madre pluripotentes inducidas", y el acrónimo de esta expresión en inglés [*induced pluripotent stem cells*, o células iPS] es actualmente familiar a cualquiera que trabaje en biología. Si pensamos que esta frase ni siquiera existía hace cinco años, su reconocimiento universal entre los científicos muestra lo importante que ha sido el avance que representa.

Resulta increíble pensar que las células de los mamíferos llevan unos 20.000 genes, y que sin embargo solo cuatro son necesarios para convertir una célula completamente diferenciada en una célula pluripotente. Con solo cuatro genes el profesor Yamanaka pudo llevar la bola desde el pie de la colina hasta el punto más alto del paisaje de Waddington.

No tuvo nada de extraño que Shinya Yamanaka y Kazutoshi Takahashi publicasen sus descubrimientos en Cell, la revista de biología más prestigiosa del mundo[2]. Lo que sí fue un poco extraño fue la reacción que ello provocó. El año 2006 todo el mundo sabía que aquel era un descubrimiento inmenso, pero solo si era cierto. Muchos

científicos no podían creer que realmente lo fuese. Ni por un momento pensaron que el profesor Yamanaka y el doctor Takahashi estuvieran mintiendo, o que hubiesen cometido algún tipo de fraude. Solo pensaban que probablemente habían cometido algún error, porque realmente la cosa no podía ser tan simple. Era como si alguien se hubiese propuesto buscar el Santo Grial y lo hubiese encontrado en el primer o segundo lugar en que había mirado, en la nevera, junto al paquete de guisantes.

Lo más obvio, por supuesto, hubiera sido que alguien repitiese el trabajo de Yamanaka y viese si podía obtener los mismos resultados. Puede parecerles extraño a quienes no trabajen en algún campo científico, pero no se produjo ninguna avalancha de laboratorios que quisieran hacerlo. Shinya Yamanaka y Kazutoshi Takahasahi habían necesitado dos años para llevar a cabo sus experimentos, que eran muy laboriosos y requerían un control meticuloso en todas sus fases. Los laboratorios también estaban fuertemente implicados en sus propios programas de investigación y no deseaban seguramente desviar sus objetivos. Además, es habitual que las organizaciones que financian equipos de investigación para que realicen unos programas específicos de trabajo miren con un cierto recelo a un jefe de laboratorio que decide abandonar súbitamente un programa acordado de investigación para dedicarse a algo totalmente diferente. Esto sería especialmente perjudicial si el resultado final fuese un montón de datos negativos. En la práctica esto significaba que solo un laboratorio excepcionalmente bien financiado, con un buen equipo y un excelente director, pensaría siquiera en "perder el tiempo" repitiendo los experimentos de otro equipo.

Rudolf Jaenisch, del Instituto Whitehead de Boston, es un auténtico coloso en el campo de la creación de animales genéticamente modificados. De origen alemán, lleva casi treinta años trabajando en Estados Unidos. Su pelo gris rizado y un mostacho francamente impresionante lo hacen inmediatamente reconocible en los congresos científicos. No fue ninguna sorpresa que fuese él el científico que decidió asumir el riesgo de dedicar a parte de su equipo de trabajo para comprobar si Shinya Yamanaka había realmente logrado lo que parecía imposible. Al fin y al cabo es Rudolf Jaenisch quien ha declarado que "me he dedicado a muchos proyectos de riesgo en mis años de trabajo, pero creo que si uno tiene una idea interesante tiene que asumir el riesgo de fracasar y llevar a cabo el experimento".

En un congreso celebrado en Colorado en abril del 2007, el profesor Jaenisch subió al estrado para presentar su trabajo e hizo público que había repetido los experimentos de Yamanaka. Y funcionaban. Yamanaka estaba en lo cierto. Era posible hacer células iPS introduciendo tan solo cuatro genes en una célula diferenciada. El

efecto entre los asistentes fue espectacular. El ambiente se asemejó al de uno de estos momentos de las películas antiguas en los que un jurado pronuncia su veredicto y todos los gacetilleros salen disparados para llamar por teléfono a la redacción.

Rudolf Jaenisch estuvo realmente elegante. Reconoció que había llevado a cabo los experimentos porque estaba convencido de que Yamanaka no podía estar en lo cierto. Después de esto, el campo entero enloqueció. Primero, los laboratorios realmente grandes implicados en la investigación con células madre empezaron a utilizar la técnica de Yamanaka, refinándola y mejorándola para que funcionara de un modo más eficaz. En un par de años incluso laboratorios que jamás habían cultivado una sola célula ES empezaron a producir células iPS con aquellos tejidos y donantes en los que estaban interesados. Actualmente se publican trabajos sobre las células iPS prácticamente cada semana. La técnica ha sido adaptada para convertir directamente fibroblastos humanos en células neuronales humanas sin necesidad de crear primero células ES[3]. Esto es equivalente a hacer rodar una bola pendiente arriba hasta la mitad del paisaje epigenético de Waddington y hacerla bajar luego por un valle diferente.

Es difícil no preguntarse si a Shinya Yamanaka no le resultó muy frustrante que nadie más pareciese interesado en seguir su trabajo hasta que el laboratorio americano demostró que tenía razón. Ha compartido el Premio Lasker del año 2009 con John Gurdon, así que tal vez no tenía motivos para estar preocupado. Su reputación está ahora asegurada.

Sigan al dinero

Si solo leemos literatura científica, el relato de esta historia resulta bastante ejemplar y sencillo. Pero existe otra fuente de información: el campo de las patentes, que normalmente no sale a la luz hasta algún tiempo después de que los artículos han sido publicados en las revistas científicas especializadas de revisión paritaria. Una vez que empezaron a aparecer solicitudes de patentes en este campo, empezó también a surgir un relato más complicado. Se requiere un tiempo para que pase esto porque las patentes son confidenciales hasta doce o dieciocho meses después de haber sido solicitadas en la oficina de patentes. Esto se hace para proteger los intereses de los inventores, ya que este período de gracia les da tiempo para seguir trabajando en áreas confidenciales sin tener que declarar al mundo lo que han inventado. Lo importante a retener es que tanto Yamanaka como Jaenisch han solicitado patentes por su investigación sobre el control del destino celular. Ambas solicitudes de patente han sido concedidas y es probable que haya que recurrir a los tribunales para saber cuál de

ellas está realmente protegida, porque lo curioso es que si bien Yamanaka *publicó* primero su trabajo, el hecho es que Jaenisch solicitó la patente antes que él.

¿Cómo es esto posible? En parte es porque una solicitud de patente puede ser bastante especulativa. El solicitante no tiene que presentar pruebas de todas y cada una de sus afirmaciones. Puede utilizar el período de gracia para tratar de obtener alguna prueba que apoye sus afirmaciones sobre el asunto en cuestión. De acuerdo con la ley norteamericana la patente de Shinya Yamanaka data del 13 de diciembre del 2005 y cubre el trabajo que hemos descrito unos párrafos más arriba sobre cómo tomar una célula somática y utilizar cuatro factores –*Oct4, Sox2, Klf4* y *c-Myc*– para convertirla en una célula pluripotente. La patente de Rudolf Jaenisch podría tener potencialmente una primera fecha legal el 26 de noviembre del 2003. Contiene una serie de aspectos técnicos y hace varias afirmaciones respecto a la expresión de un gen pluripotencial en una célula somática. Uno de los genes que sugiere es el *Oct4*. Al fin y al cabo, se sabía desde hacía tiempo que el *Oct4* era vital para el estado pluripotencial, y esta fue una de las razones de que Yamanaka lo incluyese en sus experimentos originales de reprogramación celular. Es muy probable que las discusiones legales relativas a estas patentes se prolonguen durante mucho tiempo.

Pero ¿por qué estos laboratorios, dirigidos por unos científicos fabulosos y sumamente creativos, solicitan estas patentes? Teóricamente, una patente permite a su titular tener acceso a una forma exclusiva de hacer algo. Sin embargo, en círculos académicos nadie trata nunca de impedir a un científico académico de otro laboratorio que lleve a cabo un experimento de ciencia básica. Lo que realmente hace la patente es garantizar que el inventor original gane dinero con su buena idea en vez de que sean otros quienes se forren gracias a su inventiva.

Las patentes más rentables en biología tienden a ser aquellas que pueden utilizarse para tratar enfermedades en las personas, o que ayudan a los investigadores a desarrollar con mayor rapidez nuevos tratamientos. Y este es el motivo por el que seguramente se producirá una dura batalla sobre las patentes de Jaenisch y Yamanaka. Los tribunales pueden decretar que cada vez que alguien haga células iPS habrá que pagar dinero a los investigadores e instituciones propietarios de las ideas originales. Si las compañías venden las células iPS que fabrican y tienen que dar un porcentaje de sus ingresos a los titulares de las patentes, los rendimientos potenciales pueden ser considerables. Vale la pena que echemos un vistazo a por qué estas células son consideradas como potencialmente tan valiosas en términos monetarios.

Tomemos tan solo una enfermedad, la diabetes de tipo 1. Esta enfermedad empieza normalmente en la infancia, cuando ciertas células del páncreas (las células beta localizadas en una región del páncreas que lleva el delicioso nombre de islotes de Langerhans) son destruidas por un proceso que todavía no entendemos claramente. Una vez perdidas, estas células no vuelven a crecer y como consecuencia el paciente ya no puede producir la hormona insulina. Sin insulina es imposible controlar el nivel de azúcar en la sangre y las consecuencias son potencialmente catastróficas. Antes de que descubriéramos la forma de extraer insulina de los cerdos y administrársela a los pacientes, niños y jóvenes adultos morían a consecuencia de la enfermedad. Incluso ahora, cuando podemos administrar insulina de un modo relativamente fácil (normalmente una forma humana sintetizada artificialmente), son muchos los inconvenientes. Los pacientes tienen que controlar varias veces al día sus niveles de azúcar en la sangre y variar su dosis de ingesta de insulina y alimentos para tratar de mantenerse dentro de ciertos límites. Es difícil hacer esto de modo consistente durante muchos años, especialmente para un adolescente. ¿Cuántos adolescentes consiguen sentirse motivados por algo que les puede pasar cuando tengan cuarenta años? Las consecuencias a largo plazo de la diabetes de tipo 1 son muy variadas e incluyen posible pérdida de visión, una mala circulación que puede llevar a amputaciones y enfermedades renales.

Sería estupendo si, en vez de tener que inyectarse insulina cada día, los diabéticos pudiesen simplemente recibir nuevas células beta. De este modo el paciente podría producir de nuevo su propia insulina. Los propios mecanismos internos del cuerpo son normalmente muy eficaces controlando el nivel de azúcar en la sangre, de modo que probablemente podrían evitarse muchas de las complicaciones asociadas con la enfermedad. El problema es que no hay células en el cuerpo capaces de crear células beta (estas células se encuentran al fondo de uno de los valles del paisaje de Waddington), de modo que sería necesario o bien efectuar un trasplante de páncreas o bien convertir algunas células ES humanas en células beta e implantarlas en el paciente.

Hay dos grandes problemas para ello. El primero es que los materiales donantes (tanto si son células ES como si es un páncreas completo) son escasos y ni por asomo hay suficientes para todos los diabéticos. Pero aunque los hubiera, seguiría habiendo el problema de que no serían igual que los tejidos de los pacientes. El sistema inmunológico de los pacientes los reconocería como extraños y trataría de rechazarlos. La persona podría dejar de tomar insulina pero probablemente tendría que tomar medicamentos inmunosupresores

durante toda su vida. Esto no es algo que compense, pues dichos medicamentos tienen un montón de efectos secundarios desagradables.

Las células iPS crean de repente una nueva vía de salida. Tómese una pequeña muestra de células epiteliales del paciente, al que llamaremos Freddy. Se hace un cultivo con ellas hasta tener las suficientes para trabajar (es bastante fácil). Se utilizan los cuatro factores de Yamanaka para crear un gran número de células iPS, se tratan en el laboratorio para convertirlas en células beta y se implantan en el paciente. No habrá rechazo inmune porque Freddy solo estará recibiendo células del propio Freddy. Recientemente un grupo de investigadores ha demostrado que se puede hacer exactamente esto con ratas con diabetes[4].

La cosa no es nada simple, por supuesto. Hay que superar un montón de obstáculos tecnológicos, no siendo el menor de los cuales el hecho de que uno de los factores de Yamanaka, *c-Myc*, se sabe que produce cáncer. Pero durante los años transcurridos desde la publicación en Cell de estos experimentos, se han hecho progresos sustanciales en la mejora de la tecnología, de modo que hoy se está mucho más cerca de las aplicaciones clínicas. Es posible hacer células iPS humanas casi con la misma facilidad que hacer células iPS de ratón, y no siempre es necesario utilizar *c-Myc*[5]. Hay formas de crear las células que también evitan otros de los problemas de salud más preocupantes. Por ejemplo, los primeros métodos para crear células iPS utilizaban productos animales en las fases del cultivo de las células. Esto es siempre un problema, debido al temor a la posibilidad de introducir alguna enfermedad animal rara en la población humana. Pero los investigadores ya han encontrado sustitutos sintéticos de estos productos animales[6]. El campo de la producción de células iPS está mejorando constantemente. Pero todavía no hemos llegado al límite.

Desde el punto de vista comercial, uno de los problemas es que todavía no sabemos cuáles serán las exigencias de las autoridades reguladoras respecto a la seguridad y a las pruebas a aportar antes de permitir que las células iPS sean utilizadas en humanos. Actualmente, la concesión de permisos para el uso terapéutico de las células iPS implica dos áreas diferentes de regulación médica. Esto es porque estaríamos dando a un paciente células (terapia celular) que habrían sido genéticamente modificadas (terapia génica). Los reguladores se muestran cautelosos porque muchos de los ensayos de terapias génicas que se lanzaron con tanto entusiasmo durante los años 1980 y 1990 resultaron tener pocos beneficios para los pacientes y a veces tuvieron consecuencias terribles e imprevistas, incluida la inducción de cánceres letales[7]. El número de dificultades reguladoras que las células

iPS tendrán que superar antes de poder ser administradas a los pacientes es enorme. Podría pensarse que ningún inversor querrá invertir su dinero en algo tan potencialmente arriesgado. Pero el hecho es que hay inversores, y los hay porque si los investigadores pueden poner a punto la tecnología, los beneficios pueden ser considerables.

Haciendo un cálculo conservador, en Estados Unidos cuesta aproximadamente 500 dólares mensuales suministrar insulina y el equipo para controlar el nivel de azúcar en sangre de un diabético. Esto son unos 6.000 dólares al año, o sea que para un paciente que viva con diabetes durante 40 años, el coste total será de 240.000 dólares. A esto hay que añadir el coste de todos los tratamientos que incluso los pacientes de diabetes bien gestionados necesitan para resolver las complicaciones que probablemente sufrirán durante su enfermedad. Es relativamente fácil ver que los costes de una vida de cuidados sanitarios de un paciente diabético ascenderán al menos a un millón de dólares. Y como solo en Estados Unidos hay al menos un millón de diabéticos de tipo 1, esto representa que la economía norteamericana tiene que destinar más de mil millones de dólares cada año solo para tratar la diabetes de tipo 1. Así pues, aunque sea muy costoso encontrar aplicaciones médicas para las células iPS, el hecho es que tienen el potencial para que una inversión en ellas obtenga unos beneficios enormes si estas aplicaciones resultan ser más baratas que los costes de toda una vida de terapias como las actualmente disponibles.

Y esto solo para la diabetes. Hay un montón de enfermedades para las que las células iPS podrían representar una solución. Entre los muchos ejemplos podemos citar los pacientes con problemas de coagulación sanguínea como las hemofilias; el Parkinson; la artrosis y la ceguera causada por la degeneración macular. A medida que la ciencia y la tecnología vayan creando estructuras artificiales que puedan implantarse en nuestros cuerpos, las células iPS se utilizarán para reemplazar los vasos sanguíneos dañados en los infartos de miocardio y para regenerar tejidos destruidos por el cáncer o por su tratamiento.

El Departamento de Defensa norteamericano participa en la financiación de las investigaciones sobre las células iPS. El ejército necesita siempre grandes cantidades de sangre en las situaciones de combate, para tratar a los soldados heridos. Los glóbulos rojos no son como la mayoría de las células de nuestro cuerpo. No tienen núcleo, lo que significa que no pueden dividirse para formar nuevas células. Por ello los glóbulos rojos son un tipo de células iPS relativamente seguras para ser utilizadas clínicamente, porque no permanecen en el cuerpo más de unas semanas. Tampoco rechazamos estas células del mismo

modo que las de un riñón trasplantado, por ejemplo, porque hay diferencias en las formas en que nuestros sistemas inmunológicos reconocen cada tipo de célula. Diferentes personas pueden tener glóbulos rojos compatibles –este es el famoso sistema ABO de grupos sanguíneos, más algunas complicaciones adicionales. Se ha calculado que solo con 40 donantes de grupos sanguíneos específicos se podría crear un banco de células iPS capaz de satisfacer todas nuestras necesidades[8]. Debido a que las células iPS pueden seguir dividiéndose para crear más células iPS si se cultivan en las condiciones adecuadas, es posible crear un banco interminable de células. Existen métodos bien establecidos para tomar células troncales sanguíneas inmaduras y hacerlas crecer en unas condiciones concretas para que se diferencien y formen (finalmente) glóbulos rojos. Esencialmente, sería posible crear un enorme banco de diferentes tipos de glóbulos rojos de modo que siempre tengamos sangre del grupo sanguíneo que necesite un paciente, tanto si es un soldado herido en el campo de batalla como si es una persona herida en un accidente de tráfico.

La generación de células iPS ha sido uno de estos raros acontecimientos en biología que no solo ha transformado un campo, sino que casi lo ha reinventado. Shinya Yamanaka es considerado por muchos como un firme candidato a compartir el premio Nobel con John Gurdon en un futuro próximo, y sería difícil sobreestimar el impacto tecnológico de su trabajo. Pero aunque su hallazgo es extraordinario, la naturaleza hace mucho más, y mucho más rápido.

Cuando un espermatozoide y un óvulo se fusionan, los dos núcleos son reprogramados por el citoplasma del óvulo. El núcleo del espermatozoide, en particular, pierde muy rápidamente la mayor parte de la memoria nuclear de lo que fue y se convierte casi en un lienzo en blanco. Fue el fenómeno de la reprogramación lo que explotó John Gurdon, y también Ian Wilmut y Keith Campbell cuando insertaron núcleos adultos en el citoplasma de unos óvulos y crearon nuevos clones.

Cuando un óvulo y un espermatozoide se fusionan, el proceso de reprogramación es increíblemente eficiente y concluye en unas 36 horas. Cuando Shinya Yamanaka creó por vez primera células iPS solamente un pequeño número, una minúscula fracción de menos del 1 por ciento de las células en el mejor experimento, se reprogramaron. Se necesitaron semanas, literalmente, para que las primeras células iPS reprogramadas crecieran. Se han hecho muchos progresos mejorando el porcentaje de eficiencia y rapidez en la reprogramación de células adultas en células iPS, pero ni de lejos se ha logrado lo mismo que sucede durante la fertilización normal. ¿Por qué no?

La respuesta es la epigenética. Las células diferenciadas son epigenéticamente modificadas de formas concretas a nivel molecular.

Esta es la razón de que los fibroblastos epiteliales permanezcan normalmente como fibroblastos epiteliales y no se conviertan en cardiomiocitos, por ejemplo. Cuando las células diferenciadas son reprogramadas para convertirse en células pluripotentes –ya sea por transferencia nuclear de células somáticas (TNCS) o por el uso de los cuatro factores de Yamanaka– la marca epigenética de la diferenciación ha de ser eliminada para que el núcleo se parezca más al de un zigoto recién fertilizado.

El citoplasma de un óvulo es increíblemente eficiente para revertir la memoria epigenética sobre nuestros genes, y actúa como un gigantesco borrador molecular. Esto es lo que hace muy rápidamente cuando los núcleos del óvulo y el espermatozoide se fusionan para formar un zigoto. La reprogramación artificial para crear células iPS se parece más a observar a un niño de seis años haciendo sus deberes escolares: lo que hacen es ir borrando los pequeños errores y dejando las palabras mal escritas y acaban haciendo un agujero en la página de lo vigorosamente que aplican la goma de borrar. Aunque estamos empezando a encontrarle el truco a algunos de los procesos implicados, estamos todavía muy lejos de poder recrear en el laboratorio lo que pasa en la naturaleza.

Hasta ahora hemos hablado de la epigenética a escala de los fenómenos. Ha llegado el momento de pasar al nivel de los cambios moleculares subyacentes en todos los notables fenómenos de los que hemos hablado hasta ahora, y en otras muchas cosas, además.

1. Para una revision muy útil del estado del conocimiento en esta época, véase Rao, M. (2004), Dev Biol. 275: 269-86.
2. Takahashi & Yamanaka (2006), Cell 126: 663-76.
3. Pang et al. (2011), Natureonline publications (26 de mayo).
4. Alipio et al. (2010), Proc Natl Acad Sci. USA 107: 13.426-31.
5. Nakagawa et al. (2008), Nat Biotechnol. 26: 101-6.
6. Véase, por ejemplo, Baharvand et al. (2000) Methods Mol Biol. 584: 425-43.
7. Gaspar y Trasher (2005), Expert Opin Biol Ther. 5: 1.175-82.
8. Lapillonne et al. (2010), Haematologica 95: 1.651-9.

Capítulo 3
La vida tal como la conocíamos

Un poeta puede sobrevivir a todo menos a un error de imprenta.
Oscar Wilde

Si queremos entender la epigenética, primero hemos de entender algo acerca de la genética y los genes. El código básico de casi toda la vida independiente sobre la tierra, desde las bacterias a los elefantes, desde la Fallopia japonica a los seres humanos, es el ADN (ácido desoxirribonucleico). La frase "ADN" se ha convertido en una expresión por derecho propio con unos significados cada vez más vagos. Los comentaristas sociales pueden referirse al ADN de una sociedad o de una empresa entendiendo por ello el núcleo real de valores en ellas subyacente. Existe incluso un perfume con este nombre. La imagen científica icónica de mediados del siglo XX fue la nube del hongo atómico. La doble hélice del ADN obtuvo un cachet similar durante la segunda parte del mismo siglo.

La ciencia es tan propensa a las modas y a los cambios de estado de ánimo como cualquier otra actividad humana. Hubo un período en que la ortodoxia dominante parecía ser que lo único importante era el guión de nuestro ADN, nuestro legado genético. Los capítulos 1 y 2 han mostrado que este no puede ser el caso, dado que el mismo guión se utiliza de modo diferente en función del contexto celular. Probablemente el campo corre ahora el riesgo de desplazarse demasiado en la dirección contraria, con unos expertos en epigenética casi minimizando la importancia del código del ADN. La verdad está, por supuesto, en algún punto a medio camino de ambos extremos.

En la introducción hemos descrito el ADN como un guión. En el teatro, si el guión es malo, ni un gran director ni unos magníficos intérpretes lograrán crear una gran producción. Por otro lado, todos hemos asistido probablemente a montajes horribles de nuestras obras favoritas. Y aunque el guión sea perfecto, el resultado final puede ser muy malo si la interpretación es mala. De modo similar, la genética y la epigenética trabajan estrechamente de manera conjunta para crear esos milagros que somos nosotros y todos los seres orgánicos como nosotros.

El ADN es la fuente de información fundamental en nuestras células, su programa básico. El propio ADN no es la última palabra, en el sentido de que no es él quien lleva a cabo los miles de actividades requeridas para mantenernos en vida. Este trabajo lo realizan

principalmente las proteínas. Son las proteínas las que transportan el oxígeno por nuestra sangre, las que convierten las hamburguesas y las patatas que consumimos en azúcares y otros nutrientes que pueden absorber nuestros intestinos y que utilizamos para alimentar a nuestro cerebro o para contraer los músculos que nos permiten girar las páginas de este libro. Pero es el ADN el que contiene los códigos de todas estas proteínas.

Si el ADN es un código, tiene que contener por tanto símbolos que podamos leer. Tiene que funcionar como un lenguaje. Efectivamente, esto es lo que hace exactamente el código del ADN. Puede parecer extraño si pensamos en lo complejos que somos los seres humanos, pero nuestro ADN es un lenguaje con solo cuatro letras. Estas letras se conocen como bases, y sus nombres completos son adenina, citosina, guanina y timina, palabras que se abrevian con la inicial (A, C, G y T). Vale la pena recordar la citosina (C) en particular, porque es la más importante de todas las bases en epigenética.

Una de las formas más fáciles de visualizar el ADN mentalmente es imaginándolo como una cremallera. No es una analogía perfecta, pero es un buen punto de principio. Por supuesto, una de las cosas más obvias que sabemos acerca de las cremalleras es que están formadas por dos tiras enfrentadas. Esto vale también para el ADN. Las cuatro bases del ADN son los dientes de la cremallera. Las bases de una de las tiras de la cremallera pueden unirse químicamente a las de la otra tira y mantener unida a la cremallera. Dos bases enfrentadas y unidas de este modo se conocen como un par de bases. Las tiras de tela a las que están cosidos los dientes de la cremallera son la columna vertebral del ADN. Siempre hay dos columnas enfrentadas, como las dos tiras de una cremallera, y por eso nos referimos a la doble hebra del ADN. Las dos tiras de la cremallera están básicamente enroscadas una en otra formando una espiral, la famosa doble hélice. La figura 3.1 es una representación estilizada del aspecto que tiene la doble hélice del ADN.

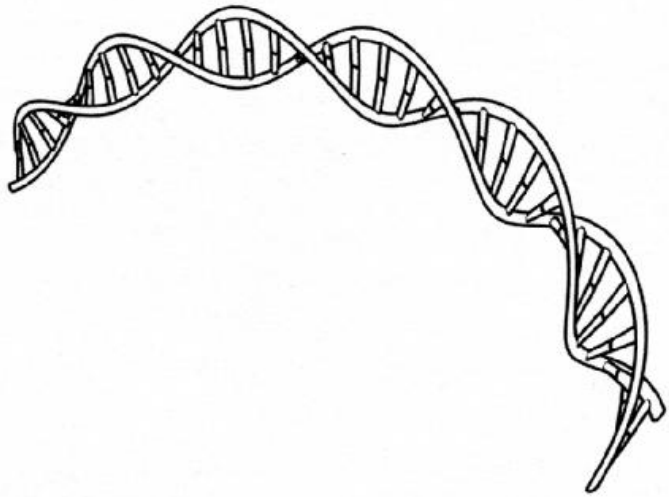

Figura 3.1: Representación esquemática del ADN. Los dos ejes están enroscados entre sí formando una doble hélice, y esta se mantiene unida gracias a los enlaces químicos entre las bases en el centro de la molécula.

No podemos llevar más lejos la analogía, porque no todos los dientes de la cremallera de ADN son equivalentes. Si uno de los dientes es una base A, solo puede unirse con una base T en la hebra opuesta. Igualmente, si hay una base G en una de las hebras, solo podrá unirse con una base C en la otra hebra. Esto se conoce como el principio del emparejamiento de las bases. Si una A tratase de unirse a una C en la hebra opuesta, se desbarataría toda la forma del ADN, de modo parecido a lo que pasa en una cremallera cuando falta un diente.

Manteniendo la pureza

El principio del emparejamiento de las bases es increíblemente importante por lo que respecta a la función del ADN. Durante el desarrollo, e incluso durante buena parte de la vida adulta, las células de nuestro cuerpo se dividen. Lo hacen para que los órganos puedan crecer a medida que un bebé madura, por ejemplo. También para reemplazar aquellas células que mueren de un modo natural. Un ejemplo de ello es la producción por parte de la médula espinal de glóbulos blancos, producidos para reemplazar a aquellos que nuestro cuerpo pierde en su constante batalla con toda clase de micro-organismos infecciosos. La mayoría de tipos de célula se reproducen copiando primero todo su ADN y luego dividiéndose igualmente entre

dos células hijas. Esta replicación del ADN es esencial. Sin ella, las células hijas podrían acabar sin ADN, lo que en la mayoría de casos las volvería completamente inútiles, como un ordenador que hubiera perdido su sistema operativo.

Es la copia del ADN antes de cada división celular lo que muestra por qué el principio del emparejamiento de bases es tan importante. Cientos de científicos han pasado toda su carrera averiguando los detalles de cómo el ADN es fielmente copiado. En esencia, el proceso es este. Las dos hebras de ADN se separan y luego el enorme número de proteínas implicadas en el proceso de copia (conocido como el complejo de replicación) se pone a trabajar.

La figura 3.2 muestra en principio lo que sucede. El complejo de replicación recorre cada una de las hebras de ADN y va construyendo una nueva hebra frente a ella. El complejo reconoce una base específica –la base C, por ejemplo– y siempre coloca una G en la posición opuesta sobre la hebra que está construyendo. Por eso el principio del emparejamiento es tan importante. Dado que C tiene que emparejarse con G y A tiene que hacerlo con T, las células pueden utilizar el ADN existente como plantilla para construir nuevas hebras. Cada célula hija acaba con una nueva copia perfecta de ADN en la que una de las hebras procede de la molécula original de ADN y la otra es el resultado de una nueva síntesis.

Incluso en la naturaleza, en un sistema que ha evolucionado a lo largo de miles de millones de años, nada es perfecto y de vez en cuando la maquinaria de la replicación comete un error. Puede que trate de insertar una T allí donde tendría que ir una C. Cuando pasa esto, el error casi siempre es reparado inmediatamente por otro conjunto de proteínas que pueden reconocer que esto es lo que ha ocurrido, sacan la base equivocada y ponen la correcta en su lugar. Esta es la maquinaria de reparación del ADN y uno de los motivos de que pueda actuar es porque, cuando se emparejan dos bases que no deberían hacerlo, reconoce que la “cremallera” de ADN no se ha hecho adecuadamente.

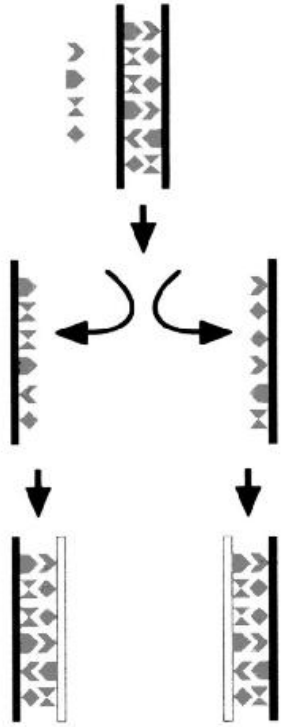

Figura 3.2: La primera fase en la replicación del ADN es la separación de las dos hebras de la doble hélice. Las bases en cada hebra separada sirven de plantilla para la creación de una nueva hebra. Esto asegura que las dos nuevas moléculas de ADN tienen exactamente la misma secuencia de bases que la molécula original. Cada nueva doble hélice de ADN tiene una hebra que originalmente formaba parte de de la molécula padre (de color negro) y una hebra recién sintetizada (de color blanco).

Las células dedican una cantidad enorme de energía a hacer que las copias de ADN sean completamente fieles a la plantilla original. Esto tiene sentido si consideramos nuestro modelo de ADN como un guión. Veamos uno de los versos más famosos de toda la literatura inglesa:

O Romeo, Romeo! wherefore art thou Romeo?

Insertando tan solo una letra extra, y sin importar lo bien que se recite el verso en escena, es poco probable que el efecto que se consiga sea el que perseguía el Bardo:

O Romeo, Romeo! wherefore fart thou Romeo?[1]

Este pueril ejemplo ilustra por qué un guión necesita ser fielmente reproducido. Lo mismo puede decirse de nuestro ADN –un cambio inapropiado (una mutación) puede tener efectos demoledores. Esto es especialmente cierto si la mutación se presenta en un óvulo o en un espermatozoide, pues esto puede llevar eventualmente al nacimiento de un individuo que tenga la mutación en todas sus células. Algunas

mutaciones tienen unos efectos clínicos devastadores, que van desde niños que envejecen de un modo tan prematuro que a los diez años tienen el cuerpo de una persona de 70, a mujeres predestinadas a desarrollar antes de los 40 años un cáncer de pecho agresivo y difícil de tratar. Afortunadamente, esta clase de mutaciones y enfermedades genéticas son relativamente raras comparadas con el tipo de enfermedades que aquejan a la mayor parte de las personas.

Los aproximadamente 50.000.000.000.000 de células que tiene un cuerpo humano son el resultado de la perfecta replicación del ADN una y otra vez, una vez que las células empiezan a dividirse después de la formación de esa célula simple llamada zigoto de la que hablamos en el capítulo 1. Esto es aún más impresionante si consideramos cuánto ADN ha de reproducirse cada vez que una célula se divide para formar dos células hijas. Cada célula contiene seis mil millones de pares de bases de ADN (la mitad procedentes originalmente del padre y la mitad de la madre). Esta secuencia de seis mil millones de pares de bases es lo que llamamos genoma. Así pues, cada división de una célula del cuerpo humano es el resultado de la copia de 6.000.000.000 de bases de ADN. Utilizando el mismo tipo de cálculo del capítulo 1, si contamos un par de bases por segundo sin interrupciones, tardaríamos unos 190 años en contar todas las bases existentes en el genoma de una célula. Cuando consideramos que un bebé nace solo nueve meses después de la creación del zigoto, podemos imaginar lo rápido que son capaces de replicar su ADN las células.

Los tres mil millones de pares de bases que heredamos de cada padre no consisten en una sola larga tira de ADN. Están dispuestas en pequeños paquetes llamados cromosomas. Lo veremos con más detalle en el capítulo 9.

Leyendo el guión

Volvamos a la cuestión más fundamental de qué es lo que hacen realmente esos seis mil millones de pares de bases del ADN, y cómo funciona el guión. Más concretamente, ¿cómo puede un código de solo cuatro letras (A, C, G y T) crear las miles y miles de diferentes proteínas que se encuentran en nuestras células? La respuesta es sorprendentemente elegante. Podría describirse como el paradigma modular de la biología molecular, pero es probablemente más útil pensar en ello como una especie de juego de construcción.

Los fabricantes del juego de construcción Lego inventaron un gran eslogan publicitario, que era muy preciso: “Es un juguete nuevo cada

día". Una caja grande Lego contiene un número limitado de diseños, esencialmente una pequeña serie de bloques de determinada forma, tamaño y color. Pero es posible utilizar estos bloques para crear modelos de cualquier cosa, desde un pato a una casa, y desde un hipopótamo a un avión. Las proteínas hacen algo muy parecido. Los "bloques" que forman las proteínas son unas moléculas bastante pequeñas llamadas aminoácidos, y hay veinte tipos estándar de aminoácido (diferentes piezas Lego) en nuestras células. Pero estos veinte aminoácidos pueden unirse entre sí en una increíble serie de combinaciones de cada clase y longitud para crear un número enorme de proteínas.

Esto nos deja todavía el problema de cómo incluso solo veinte aminoácidos pueden ser codificados con solo las cuatro bases que hay en el ADN. La forma en que esto funciona es que la maquinaria celular "lee" el ADN en bloques de tres bases de pares a la vez. Cada bloque de tres bases forma lo que se llama un codón, por ejemplo AAA, GCG o cualquier otra combinación de A, C, G y T. Con solo cuatro bases es posible crear sesenta y cuatro codones diferentes, más que suficiente para hacer veinte aminoácidos. Algunos aminoácidos son codificados por más de un codón. Por ejemplo, el aminoácido llamado lisina es codificado por los codones AAA y AAG. Unos cuantos codones no codifican ningún aminoácido, sino que actúan como señales para informar a la maquinaria celular que ha llegado al final de la secuencia codificadora de una proteína. Estos codones se conocen como codones de terminación o codones stop.

¿Cómo actúa exactamente el ADN de nuestros cromosomas para producir proteínas? Lo hace por medio de una proteína intermediaria, una molécula llamada ARN mensajero (ARNm). El ARNm es muy parecido al ADN, si bien con algunos detalles significativos. Su eje es ligeramente distinto del eje del ADN (de ahí el nombre ARN, que significa "ácido ribonucleico" y no "ácido desoxirribonucleico"); tiene una sola hebra (un solo eje); sustituye la base T por otra muy parecida pero algo diferente llamada U (no hace falta entrar aquí en las razones de esta sustitución). Cuando un fragmento particular de ADN es "leído" para producir una proteína utilizando esta parte del guión, un gran complejo de proteínas abre la cremallera del ADN y realiza copias de ARNm. El complejo utiliza el principio del emparejamiento para hacer copias perfectas del ARN. Las moléculas de ARNm se utilizan luego como plantillas provisionales en las estructuras especializadas de la célula que producen proteínas. Estas leen las tres letras del codón y unen los aminoácidos adecuados para formar las cadenas más largas de las proteínas. Hay otras muchas cosas, por supuesto, pero este nivel de detalle es probablemente suficiente.

Aquí puede ser útil una analogía sacada de la vida cotidiana. El

proceso de pasar del ADN al ARNm a la proteína es un poco como controlar la imagen de una fotografía digital. Supongamos que tomamos una fotografía de algo maravilloso con una cámara digital. Queremos que otras personas tengan acceso a la imagen, pero no queremos que puedan cambiar el original de ningún modo. El archivo de datos de la cámara es como el programa del ADN. Lo copiamos en otro formato que no pueda cambiarse demasiado –un archivo PDF, por ejemplo– y luego enviamos por correo electrónico miles de copias de este PDF a cualquiera que lo pida. El PDF es el ARN mensajero. Si la gente quiere puede imprimir tantas copias en papel como deseen de este PDF, y estas copias en papel son las proteínas. Así, todo el mundo puede imprimir la imagen, pero solo hay un archivo original.

¿Por qué tiene que ser tan complicado? ¿Por qué no puede haber un mecanismo más directo? Son varias las razones por las que la evolución ha favorecido este método indirecto. Una de ellas es evitar que sufra daños el guión, el original del archivo de datos de la imagen. Cuando se abre la cremallera del ADN, este puede sufrir daños y esto es algo que la evolución ha enseñado a las células a evitar. La forma indirecta en que el ADN codifica las proteínas minimiza el período de tiempo durante el cual un fragmento particular del ADN está abierto y es vulnerable. El otro motivo de que la evolución haya favorecido este método indirecto es que permite controlar la cantidad que se produce de una proteína específica, y esto crea flexibilidad.

Considérese la proteína denominada alcohol deshidrogenasa (ADH). Esta proteína se produce en el hígado y descompone el alcohol. Si tomamos muchas bebidas alcohólicas, las células de nuestro hígado aumentan la cantidad de ADH que producen. Si dejamos de beber durante un tiempo, el hígado produce menos de esta proteína. Esta es una de las razones de que las personas que beben frecuentemente pueden tolerar mejor los efectos inmediatos del alcohol que aquellas que beben más raramente, que pueden achisparse fácilmente tomando solo un par de copas de vino. Cuanto más alcohol bebemos, más proteína ADH produce nuestro hígado (hasta un límite). Las células del hígado no hacen esto incrementando el número de copias del gen del ADH. Lo hacen leyendo el gen del ADH de un modo más eficiente, es decir, produciendo más copias de ARNm y/o utilizándolas con mayor eficiencia como plantillas para producir la proteína.

Como veremos, la epigenética es uno de los mecanismos que utiliza una célula para controlar la cantidad de una proteína particular que produce, especialmente controlando cuántas copias de ARNm hace a partir de la plantilla original.

En los párrafos anteriores hemos explicado cómo codifican las proteínas los genes. ¿Cuántos genes hay en nuestras células? Esta parece una pregunta muy sencilla, pero por extraño que parezca no

hay una cifra en la que todos estén de acuerdo. Esto es así porque los científicos no han llegado a un acuerdo acerca de cómo definir lo que es un gen. La definición inicial era muy simple: un gen era un fragmento de ADN que codificaba una proteína. Ahora sabemos que esta definición es demasiado simplista. Sin embargo, sigue siendo cierto que todas las proteínas son codificadas por los genes, aunque no todos los genes codifiquen proteínas. En nuestro ADN hay entre 20.000 y 24.000 genes que codifican proteínas, un número mucho menor que los 100.000 genes que la mayoría de científicos consideraban más probable hace tan solo diez años[2].

Editando el guión

La mayor parte de los genes en las células humanas tienen una estructura bastante similar. Hay una región al comienzo llamada el promotor que liga a los complejos de proteínas que copian el ADN para formar el ARNm. Los complejos de proteínas recorren lo que se conoce como el cuerpo del gen haciendo una larga tira de ARNm, hasta que llegan al final del gen.

Imaginemos un gen con un cuerpo de 3.000 pares de bases de longitud, una longitud perfectamente razonable para un gen. El ARNm también tendrá una longitud de 3.000 pares de bases. Cada aminoácido es codificado por un codón compuesto de tres bases, por lo que podemos predecir que este ARNm codificará una proteína de 1.000 aminoácidos de longitud. Pero, inesperadamente, lo que encontramos es que normalmente la proteína suele ser considerablemente más corta.

Si escribimos la secuencia de un gen el resultado es una larga tira de combinaciones de las letras A, C, G y T. Pero si la analizamos con el software adecuado encontramos que esta larga tira puede dividirse en dos tipos de secuencias. El primer tipo es un exón (por “secuencia expresada”) y un exón puede codificar una serie de aminoácidos. El segundo tipo es un intrón (por “secuencia inexpresada”), y este no codifica ninguna serie de aminóacidos, sino que contiene montones de codones de parada que indican que la proteína tiene que concluir.

La primera vez que se copia el ARNm a partir del ADN, contiene la serie completa de exones e intrones. Una vez creada esa larga molécula de ARN, interviene otro complejo de proteínas multi-subunidades. Este complejo elimina todas las secuencias de intrones y luego ensambla los exones para crear un ARNm que codifique una serie continua de aminoácidos. Este proceso de edición se conoce como ‘ensamblaje’ [splicing].

Una vez más, este proceso parece sumamente complicado, pero hay una buena razón para que este complejo mecanismo haya sido favorecido por la evolución. La razón es que permite a la célula utilizar un número relativamente pequeño de genes para crear un número mucho mayor de proteínas. La forma en que esto funciona se muestra en la figura 3.3.

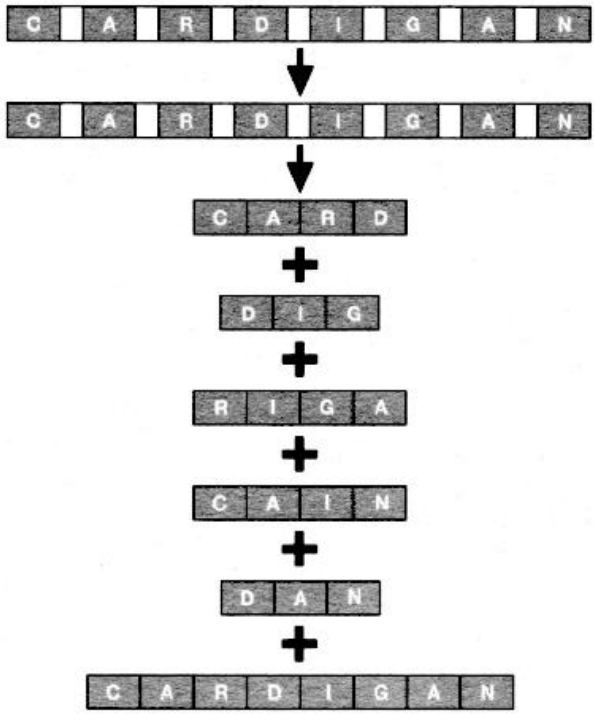

Figura 3.3: La molécula representada en la parte superior de este diagrama es una molécula de ADN. Las partes sombreadas son los exones, que codifican series de aminoácidos. Los intrones, que no codifican secuencias de aminoácidos, están representados por las partes sin sombrear. La primera vez que se copia el ADN en forma de ARN, proceso que se indica con la primera flecha, el ARN contiene tanto los intrones como los exones. Luego, la maquinaria celular elimina algunos intrones, o todos ellos (proceso conocido como splicing). Las moléculas finales de ARN mensajero pueden, por tanto, codificar varias proteínas a partir del mismo gen, tal como se representa en las varias palabras que se muestran en el diagrama. Para mayor sencillez, todos los intrones y exones han sido dibujados igual de grandes, pero en realidad pueden variar mucho de tamaño.

El ARNm inicial contiene todos los exones y todos los intrones. Luego el splicing elimina los intrones. Durante el proceso también pueden eliminarse algunos exones, con lo que algunos de ellos permanecerán en el ARNm final y otros serán pasados por alto. Las diversas proteínas que de este modo se crean pueden tener funciones similares o diferir radicalmente. La célula puede expresar diferentes proteínas en función de aquello que tienen que hacer en un momento determinado, o debido a que recibe diferentes señales. Si definimos un gen como aquello que codifica una proteína, este mecanismo significa que unos 20.000 genes bastan para codificar mucho más de 20.000 proteínas.

Siempre que describimos el genoma lo hacemos en términos muy

bidimensionales, casi como si fuera la vía del tren. El laboratorio de Peter Fraser en el Instituto Babraham de Cambridge ha publicado una obra extraordinaria que muestra que probablemente no tiene nada que ver con esto. Fraser trabaja en los genes que codifican las proteínas requeridas para hacer hemoglobina, el pigmento de los glóbulos rojos que transporta oxígeno por todo el cuerpo. Hay una serie de proteínas que son necesarias para crear el pigmento final, y se encuentran en diferentes cromosomas. El doctor Fraser ha mostrado que en las células que producen grandes cantidades de hemoglobina, estas regiones del cromosoma se vuelven blandas y serpentean como tentáculos saliendo del cuerpo de un pulpo. Estas regiones blandas se mezclan en una pequeña área del núcleo de la célula agitándose hasta que se encuentran. De este modo aumenta la probabilidad de que todas las proteínas necesarias para crear el pigmento funcional de la hemoglobina se expresen simultáneamente[3].

Cada célula de nuestro cuerpo contiene 6.000.000.000 de pares de bases. Unos 120.000.000 de estas codifican proteínas. Ciento veinte millones parecen mucho, pero en realidad solo son el 2 por ciento del total. Así, aunque creamos que las proteínas son lo más importante que producen nuestras células, un 98 por ciento de nuestro genoma no codifica proteínas.

Hasta hace poco, el hecho de que tengamos tanto ADN cuando solo un porcentaje tan bajo del mismo produce proteínas era un completo misterio. Durante los últimos diez años hemos empezado a desvelar este misterio, y una vez más hemos visto que está relacionado con la regulación de la expresión de los genes mediante mecanismos epigenéticos. Ha llegado el momento de pasar a considerar la biología molecular de la epigenética.

1. La inserción una sola letra, la f que convierte la palabra *art* [la segunda persona del presente indicativo del verbo estar] en la palabra *fart* [pedo] cambia completamente el sentido y el tono del verso. (N. *de* T.).
2. Véase: http://genome.wellcome.ac.uk/doc_WTD020745.htm para una serie muy útil de cifras y hechos relacionados con el genoma.
3. Schoenfelder et al. (2010), Nat Genet 42: 53-61.

Capítulo 4
La vida tal como la conocemos

En la ciencia lo importante no es tanto encontrar nuevos hechos como descubrir nuevas formas de pensar en ellos.
Sir William Bragg

Hasta ahora este libro se ha centrado principalmente en resultados, en las cosas que podemos observar y que nos dicen que se producen acontecimientos epigenéticos. Pero todo fenómeno biológico tiene una base física y de esto trata este capítulo. Todos los resultados epigenéticos que hemos descrito son consecuencia de variaciones en la expresión de los genes. Las células de la retina expresan un conjunto de genes diferente del de las células de la vejiga, por ejemplo. ¿Pero cómo activan o desactivan diferentes tipos de célula diferentes conjuntos de genes?

El tipo de células especializadas de la retina y de la vejiga se encuentran en el fondo de uno de los valles del paisaje epigenético de Waddington. La obra de John Gurdon y Shinya Yamanaka nos demostró que sea cual sea el mecanismo que utilicen las células para permanecer en estos valles, esto no tiene nada que ver con un cambio en el programa del ADN de la célula. Este permanece intacto e inalterado. Por lo tanto, la activación y desactivación de determinados conjuntos de genes tiene que producirse mediante otro mecanismo, uno capaz de mantenerse durante mucho tiempo. Sabemos que este tiene que ser el caso porque algunas células, como las neuronas del cerebro, son notablemente longevas. Las neuronas del cerebro de una persona de 85 años, por ejemplo, tienen unos 85 años de edad. Se formaron cuando el individuo era muy joven y han permanecido igual durante el resto de su vida.

Pero otras células son diferentes. La capa superior de las células de la piel, la epidermis, se reemplaza aproximadamente cada cinco semanas, a partir de células troncales en las capas profundas de este tejido que están dividiéndose constantemente. Estas células troncales producen siempre nuevas células epiteliales y no, por ejemplo, células musculares. Por consiguiente, el sistema que mantiene activados o desactivados determinados conjuntos de genes tiene que ser también un mecanismo que pueda pasar de la célula madre a las células hijas cada vez que se produce una división celular.

Esto crea una paradoja. Desde los trabajos de Oswald Avery y sus colegas a mediados de los años 1940, los investigadores saben que el

ADN es el material que contiene nuestra información genética. Si el ADN sigue siendo el mismo en los diferentes tipos de células de un individuo, ¿cómo pueden las pautas increíblemente precisas de expresión de los genes transmitirse durante las generaciones de división celular?

La analogía de unos lectores leyendo un guión nos será de nuevo útil. Baz Luhrmann entrega a Leonardo DiCaprio el guión basado en la obra de Shakespeare Romeo y Julieta en el que ha escrito diversas anotaciones –indicaciones, movimientos de cámara y otras informaciones técnicas. Cada vez que el ejemplar del guión de Leo es fotocopiado, las indicaciones adicionales de Baz Luhrmann también se copian. Claire Danes también tiene el guión de Romeo y Julieta. Las anotaciones que hay en su ejemplar son diferentes de las de su compañero de reparto, pero también sobreviven a las fotocopias. Así es como se produce la regulación epigenética de la expresión de los genes –diferentes células tienen el mismo guión de ADN (el guión del autor original), pero contienen varias modificaciones moleculares (el guión de rodaje) que puede transmitirse de la célula madre a las células hijas durante la división celular.

Estas modificaciones en el ADN no cambian la naturaleza esencial del alfabeto (A, C, G y T) de nuestro guión o programa genético. Cuando un gen se activa y es copiado para hacer ARNm, este ARNm tiene exactamente la misma secuencia, controlada por las reglas del emparejamiento de bases, independientemente de si el gen contiene o no un añadido epigenético. De modo semejante, cuando el ADN es copiado para formar nuevos cromosomas para la división celular, se copia la misma secuencia de A, C, G y T.

Ya que las modificaciones epigenéticas no cambian aquello que un gen codifica, ¿qué es lo que hacen? Básicamente pueden cambiar de un modo espectacular cómo se expresa un gen, o simplemente decidir si se expresa o no. Las modificaciones epigenéticas también pueden transmitirse cuando una célula se divide, y esto proporciona un mecanismo que explica cómo la expresión de un gen permanece consistente desde la célula madre a las células hijas. Y esta es la razón de que las células troncales epiteliales solo produzcan células epiteliales y no células de otro tipo.

Marcando el ADN

La primera modificación epigenética identificada fue la metilación del ADN. La metilación es la adición de un grupo metilo a otra sustancia química, en este caso el ADN. Un grupo metilo es muy

pequeño. Es un solo átomo de carbono unido a tras átomos de hidrógeno. Los químicos describen los átomos y las moléculas por su "peso molecular", en que el átomo de cada elemento tiene un peso diferente. El peso molecular medio de un par de bases es de unos 600 Da (Da significa Daltons, la unidad utilizada para el peso molecular). Un grupo metilo pesa tan solo 15 Da. Añadir un grupo metilo a un par de bases solo incrementa su peso un 2,5 por ciento. Es como pegar un grano de uva a una pelota de tenis.

La figura 4.1 muestra el aspecto químico de la metilación del ADN. La base que se muestra es la citosina. Es la única de las cuatro bases del ADN que es metilada, para formar 5-metilcitosina. El "5" se refiere a la posición del anillo en la que se adjunta el grupo metilo, no al número de grupos metilo; siempre hay un solo grupo de estos. Esta reacción de metilación se lleva a cabo en nuestras células y en las de otros muchos organismos mediante una de tres enzimas llamadas DNMT1, DNMT3A o DNMT3B. DNMT son las siglas de metiltransferasa del ADN. Las DNMTs son ejemplos de "marcadores" epigenéticos –enzimas que crean el código epigenético. La mayoría de las veces estas enzimas añaden solo un grupo metilo a una C seguida por una G. Una C seguida por una G se conoce como CpG.

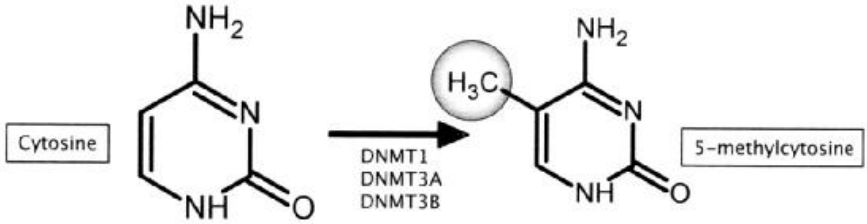

Figura 4.1: Estructuras químicas de la base citosina y de su forma epigenéticamente modificada 5-metilcitosina. C: Carbono; H: Hidrógeno; N: Nitrógeno; O: Oxígeno. Para mayor simplicidad, algunos átomos de carbono no se muestran explícitamente, pero están presentes allí donde hay un enlace de dos líneas.

Esta metilación CpG es una modificación epigenética, también conocida como una marca epigenética. El grupo químico se "adhiere" al ADN pero no altera realmente la secuencia genética subyacente. La C es decorada más que cambiada. Dado que la modificación es tan pequeña, es tal vez sorprendente que aparezca una y otra vez en este libro y en todas las discusiones sobre epigenética. Esto se debe a que la metilación del ADN tiene unos efectos profundos en la forma en que se expresan los genes, y en última instancia en las funciones de las células, los tejidos y el cuerpo en su conjunto.

A comienzos de los años 1980 se demostró que si se inyectaba ADN en células de mamíferos, la cantidad de metilación en el ADN inyectado afectaba a lo bien que se transcribía en ARN. Cuanto más metilado estaba el ADN inyectado, menos transcripciones tenían lugar[1]. Dicho de otro modo, altos niveles de metilación estaban asociados con qué genes se desactivaban. De todos modos no estaba claro qué importancia tenía esto en el caso de los genes que normalmente se encuentran en los núcleos de las células, a diferencia de los que se inyectan en las células.

El trabajo fundamental para establecer la importancia de la metilación en células de mamífero se llevó a cabo en el laboratorio de Adrian Bird, que ha pasado la mayor parte de su carrera científica en Edimburgo, el antiguo territorio de Conrad Waddington. El profesor Bird es miembro de la Royal Society y ex director de la Wellcome Trust, una de las fundaciones científicas independientes más influyentes del Reino Unido. Bird es uno de estos científicos británicos tradicionales –discreto, de maneras suaves, nada estridente y sobriamente gracioso. Su falta de autobombo contrasta con su reputación de estrella científica internacional, pues es generalmente considerado el padre de la metilación del ADN y del rol de esta en el control de la expresión de los genes.

En 1985 Adrian Bird publicó un artículo fundamental en Cell en el que demostraba que la mayor parte de los grupos CpG no estaban

aleatoriamente distribuidos por el genoma. En realidad, la mayoría de pares CpG se concentraban en la región promotora de determinados genes[2]. Los promotores son los fragmentos del genoma a los que se unen los complejos de transcripción del ADN para copiar este en forma de ARN. Las regiones en las que hay una alta concentración de motivos CpG se conocen como islas CpG.

En el 60 por ciento de los genes que codifican proteínas, los promotores se encuentran dentro de islas CpG. Cuando estos genes están activos los niveles de metilación en la isla CpG son bajos. Las islas CpG tienden a estar muy metiladas solo cuando los genes están desactivados. Diferentes tipos de célula expresan diferentes genes, de modo que, de manera nada sorprendente, las pautas de metilación de las islas CpG también son diferentes en diferentes tipos de células.

Durante mucho tiempo hubo un debate considerable acerca del significado de esta asociación. Era el viejo debate de la causa o el efecto. Una interpretación era que la metilación del ADN era esencialmente una modificación histórica –los genes eran reprimidos por un mecanismo desconocido y luego el ADN se metilaba. Según este modelo, la metilación era solo una consecuencia de la represión del gen. La otra interpretación era que la isla CpG se metilaba y era esta metilación la que desactivaba al gen. Según este otro modelo la modificación epigenética realmente causa el cambio en la expresión del gen. Aunque todavía se producen de vez en cuando debates al respecto entre laboratorios rivales, la gran mayoría de los científicos que trabajan en este campo creen que los datos generados en el cuarto de siglo transcurrido desde el trabajo de Adrian Bird son consistentes con el segundo modelo, el causal. En la mayoría de circunstancias, la metilación de la isla CpG al principio de un gen lo desactiva.

Adrian Bird siguió investigando cómo la metilación del ADN desactiva a los genes. Mostró que cuando el ADN es metilado, se liga a una proteína llamada MeCP2 (Methyl CpG binding protein 2)[3]. Sin embargo, esta proteína no se liga a motivos CpG no metilados, lo que no deja de ser asombroso cuando miramos la figura 4.1 y vemos lo semejantes que son realmente las formas metilada y no metilada de la citosina. Las enzimas que ligan el grupo metilo al ADN han sido descritas como los escritores del código epigenético. La proteína MeCP2 no añade ninguna modificación al ADN. Su papel es capacitar a la célula para que interprete las modificaciones en una región del ADN. MeCP2 es un ejemplo de “lector” del código epigenético.

Una vez que MeCP2 se une a la 5-metilcitosina en un promotor parece hacer varias cosas. Atrae a otras proteínas que también contribuyen a desactivar al gen[4]. También puede detener la maquinaria de transcripción del ADN e impide que se produzca la molécula del ARN mensajero[5]. Cuando los genes y sus promotores

están muy metilados, la fijación de MeCP2 parece ser parte de un proceso en el que esta región de un cromosoma se paraliza de modo casi permanente. El ADN se enrolla increíblemente y la maquinaria de transcripción del gen no puede acceder a los pares de bases para hacer copias de ARNm.

Este es uno de los motivos por los que la metilación del ADN es tan importante. ¿Recuerdan aquellas neuronas de 85 años de edad del cerebro de un anciano? Durante más de ocho décadas la metilación ha mantenido a ciertas regiones del genoma increíblemente compactas y por ello las neuronas han mantenido a ciertos genes completamente reprimidos. Por esto las neuronas de nuestro cerebro nunca producen hemoglobina, por ejemplo, o enzimas digestivas.

Pero ¿qué hay de la otra situación, el ejemplo de las células troncales de la piel dividiéndose muy frecuentemente pero siempre creando solamente nuevas células de piel y no otros tipos de célula como las de hueso? En esta situación, el patrón de metilación del ADN pasa de célula madre a células hijas. Cuando las dos hebras de la doble hélice del ADN se separan, cada una de ellas es copiada utilizando el principio del emparejamiento de bases, como vimos en el capítulo 3. La figura 4.2 ilustra lo que sucede cuando esta replicación se produce en una región en la que el par CpG es metilado en la C.

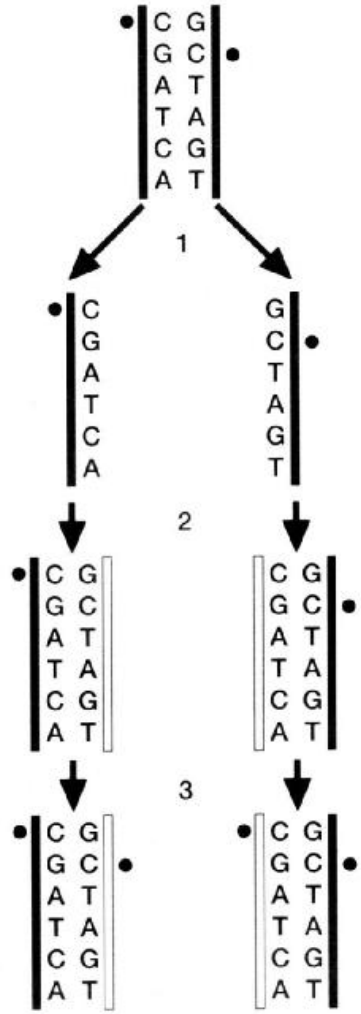

Figura 4.2: Este dibujo esquemático muestra cómo las pautas de metilación del ADN pueden preservarse cuando el ADN es replicado. El grupo metilo es representado por un círculo negro. Siguiendo la separación de la doble hélice del ADN padre en el paso 1 y la replicación de las dos hebras del ADN en el paso 2, las nuevas hebras son 'revisadas' por la enzima metiltransferasa 1 del ADN (DNMT1). La enzima DNMT1 puede reconocer que un grupo metilo en una citosina en una hebra de una molécula de ADN no tiene el grupo correspondiente en la hebra recién sintetizada. La enzima DNMT1 transfiere un grupo metilo a la citosina de la nueva hebra (paso 3). Esto solo ocurre cuando una C y una G están juntas en un par CpG. Este proceso garantiza que las pautas de metilación del ADN se mantienen después de la replicación del ADN y de la división celular.

DNMT1 puede reconocer si un par CpG solo está metilado en una hebra. Cuando DNMT1 detecta este desequilibrio, sustituye la metilación que falta en la hebra recién copiada. Las células hijas acaban por tanto teniendo las mismas pautas de metilación del ADN

que la célula madre. En consecuencia, reprimen a los mismos genes que la célula madre y las células de piel siguen siendo células de piel.

Ratones milagrosos en YouTube

La epigenética tiene tendencia a aflorar en lugares en los que los científicos no se lo esperan. Uno de los ejemplos recientes más interesantes de esto está relacionado con MeCP2, la proteína que lee la marca de metilación del ADN. Hace unos años, la teoría actualmente desacreditada según la cual la triple vacuna MMR (contra el sarampión, las paperas y la rubéola) provoca autismo estaba en auge y recibía un tratamiento desproporcionado en los medios de comunicación. Un periódico británico muy respetable se ocupó en profundidad de la historia increíblemente triste de una niña. Al principio, la niña había superado sin problemas las primeras fases del desarrollo. Pero poco después de recibir la inyección de la vacuna MMR, antes incluso de cumplir su primer año de vida, empezó a deteriorarse rápidamente, perdiendo la mayor parte de las habilidades que ya había adquirido. En el momento en que el periodista redactaba su reportaje, la niña tenía unos cuatro años y el autor describía sus síntomas autísticos como los más severos que jamás había visto. No había desarrollado el lenguaje, parecía tener serios problemas de aprendizaje y sus acciones eran muy limitadas y repetitivas, y utilizaba muy poco las manos con una finalidad clara (no las extendía para coger comida, por ejemplo). El desarrollo de esa severa discapacidad era indudablemente una tragedia para ella y para su familia.

Pero si un lector con nociones de neurogenética leyera ese artículo le sorprenderían inmediatamente dos cosas. La primera, que es muy raro –no imposible, pero poco común– que una niña sufra una forma tan severa de autismo. Esto es mucho más frecuente en niños. La segunda, que el caso de aquella niña tenía un parecido extraordinario con una afección genética llamada síndrome de Rett que se caracteriza por un desarrollo temprano normal y por la aparición del mismo tipo de síntomas en el mismo momento en que se habían manifestado en la niña. Es solo una coincidencia que los síntomas del síndrome de Rett y los de muchos tipos de autismo empiecen a aparecer más o menos por la misma época en que suele administrarse la vacuna MMR.

Pero ¿qué tiene esto que ver con la epigenética? En 1999, un grupo de investigadores dirigido por la eminente neurogenetista Huda Zoghbi en el Howard Hughes Medical Institute de Maryland demostró que la mayoría de casos de síndrome de Rett eran causados por

mutaciones en MeCP2, el gen que codifica al lector del ADN metilado. Los niños con esta afección tienen una mutación en el gen MeCP2, lo que significa que no producen una proteína MeCP2 funcional. Aunque sus células son perfectamente capaces de metilar correctamente el ADN, no son capaces de leer bien esta parte del código epigenético.

Los síntomas clínicos severos de los niños con la mutación MeCP2 nos dicen que leer bien el código epigenético es muy importante. Pero también nos dicen otras cosas. No todos los tejidos de las niñas con síndrome de Rett se ven igualmente afectados, por lo que tal vez este camino epigenético en particular es más importante en unos tejidos que en otros. Dado que las niñas desarrollan un retraso mental severo, podemos deducir que tener las cantidades normales de la proteína MeCP2 es muy importante en el cerebro. Y dado que estas niñas no parecen verse seriamente afectadas en otros tejidos, como el hígado o los riñones, por ejemplo, es posible que la actividad de MeCP2 en estos tejidos no sea tan importante. Puede ser que la propia metilación del ADN no sea fundamental en estos órganos, o que sus tejidos contengan otras proteínas además de MeCP2 capaces de leer esta parte del código epigenético.

A la larga, científicos, médicos y las familias con niños afectados por el síndrome de Rett desearían que fuésemos capaces de utilizar los conocimientos que ya tenemos de esta enfermedad para encontrar mejores tratamientos. Es un reto enorme, ya que estamos tratando de intervenir en una enfermedad que afecta al cerebro como resultado de una mutación genética que está presente en todo el desarrollo y más allá.

Uno de los aspectos más incapacitantes del síndrome de Rett es el retraso mental profundo, un síntoma casi universal de esta enfermedad. Nadie sabía si sería posible revertir un problema de desarrollo neuronal como el retraso mental una vez establecido, pero el sentimiento general al respecto no era en absoluto optimista. Adrian Bird sigue siendo uno de los principales personajes de esta historia. El año 2007 publicó un increíble artículo en la revista Science en la que él y sus colegas demostraban que el síndrome de Rett podía ser reversible, en un modelo de ratón con esta enfermedad.

Adrian Bird y sus colegas crearon una variedad clónica de ratones en la que el gen MeCP2 había sido desactivado. Utilizaron para ello las innovadoras tecnologías desarrolladas por Rudolf Jaenisch. Estos ratones desarrollaron diversos problemas neurológicos, y al llegar a adultos apenas realizaban alguna de las actividades normales en un ratón. Si ponemos un ratón normal en el centro de una gran caja blanca, empezará casi inmediatamente a explorar sus alrededores. Se moverá mucho, tenderá a seguir los bordes de la caja del mismo modo que un ratón doméstico corretea por los zócalos de la casa,

levantándose frecuentemente sobre las dos patas traseras para tener una vista mejor. Un ratón con la mutación MeCP2 hace muy pocas de estas cosas; si lo dejamos en medio de una gran caja blanca, tenderá a quedarse quieto allí mismo.

Cuando Adrian Bird creó su variedad de ratones con la mutación MeCP2, la diseñó para que los ratones llevasen también una copia normal del gen MeCP2. Sin embargo, dicha copia normal permaneció silenciosa y no se activó en las células de los ratones. La parte realmente ingeniosa del experimento consistió en que si se administraba una sustancia química concreta perfectamente inocua a los ratones, el gen MeCP2 se activaba. Esto permitió a los experimentadores dejar que los ratones se desarrollasen y creciesen sin MeCP2 en sus células, y luego, en un momento de su elección, podían activar el gen MeCP2.

Los resultados de esta activación del gen MeCP2 fueron extraordinarios. Ratones que previamente se quedaban quietos en medio de la caja blanca se convirtieron de pronto en los ávidos exploradores que suelen ser los ratones[6]. En YouTube pueden verse varios videoclips de estos experimentos junto con entrevistas a Adrian Bird en las que básicamente reconoce que realmente no esperaba obtener unos resultados tan espectaculares[7].

La importancia de este experimento reside en el hecho de que nos permite albergar esperanzas de que tarde o temprano seremos capaces de encontrar nuevos tratamientos para unas enfermedades neurológicas realmente complejas. Antes de la publicación del artículo de Bird en Science, se daba por supuesto que una vez que una enfermedad neurológica compleja se ha desarrollado, es imposible revertirla. Esto se consideraba especialmente cierto en el caso de aquellas enfermedades que surgen durante el desarrollo, es decir, en el útero o en la primera infancia. Durante este crítico período, el cerebro mamífero realiza la mayor parte de conexiones y estructuras que utilizará durante el resto de su vida. Los resultados obtenidos con los ratones mutantes de MeCP2 sugieren que en el síndrome de Rett probablemente están presentes en el cerebro todas las piezas de la maquinaria celular que se necesitan para la función neurológica normal, y que solo es preciso activarlas adecuadamente. Si esto fuese cierto para los humanos (y a nivel cerebral no somos realmente tan diferentes de un ratón), nos permitiría albergar esperanzas de que algún día podremos desarrollar terapias para invertir trastornos tan complejos como el retraso mental. No podemos hacer esto de la misma forma que se ha hecho con ratones, pues este fue un enfoque genético que solo es posible con animales experimentales y no con humanos, pero es un indicio de que vale la pena ensayar fármacos que puedan tener un efecto similar.

La metilación del ADN es claramente muy importante. Los defectos en la lectura de la metilación del ADN pueden conducir a un trastorno neurológico complejo y devastador que deje a los niños con síndrome de Rett severamente incapacitados para el resto de sus vidas. La metilación del ADN también es esencial para mantener las pautas correctas de expresión de los genes en diferentes tipos de células, ya sea durante varias décadas, como en el caso de nuestras neuronas más longevas, o en todas las células hijas de una célula troncal en un tejido constantemente reemplazado como el de la piel.

Pero todavía tenemos que resolver un problema conceptual. Las neuronas son muy diferentes de las células de la piel. Si ambos tipos de células utilizan la metilación del ADN para desactivar determinados genes y para mantenerlos desactivados, tienen que utilizar la metilación en diferentes conjuntos de genes. De lo contrario todas ellas expresarían los mismos tipos de genes, en la misma medida, y entonces serían inevitablemente el mismo tipo de células en vez de ser unas neuronas y otras células de la piel.

La solución al problema de cómo dos tipos de célula pueden utilizar el mismo mecanismo para obtener resultados tan diferentes reside en que la metilación del ADN se produce en regiones diferentes del genoma en diferentes tipos de célula. Esto nos lleva a la segunda gran área de la epigenética molecular: las proteínas.

El ADN tiene un amigo

El ADN se describe a menudo como si fuese una molécula desnuda, es decir, ADN y nada más. Si la visualizamos mentalmente, la doble hélice de ADN parece probablemente una vía de ferrocarril muy larga y retorcida. Así es más o menos como lo hemos descrito en el capítulo anterior. Pero en realidad no es así en absoluto, y muchos de los grandes avances en epigenética se han producido cuando los científicos han empezado a apreciarlo plenamente.

El ADN está íntimamente asociado con las proteínas, y en particular con unas proteínas llamadas histonas. En estos momentos casi toda la atención en el campo de la epigenética y la regulación de los genes está centrada en cuatro histonas en particular llamadas H2A, H2B, H3 y H4. Estas histonas tienen una estructura conocida como “globular” debido a que se doblan en forma de bolas compactas. Sin embargo, todas ellas poseen una flexible cadena de aminoácidos que sobresale de la bola y que se conoce como la cola de la histona. Dos copias de cada una de estas cuatro histonas se unen formando una estructura compacta denominada el octámero de la histona (así llamado por estar

formado por ocho histonas individuales).

Podríamos representarnos más fácilmente este octámero como ocho bolas de ping-pong dispuestas una encima de otra en dos capas. El ADN se enrosca apretadamente alrededor de una pila de octámeros como una larga tira de regaliz en torno a una serie de malvaviscos, formando una estructura llamada el nucleosoma. Ciento cuarenta y siete pares de bases del ADN se enroscan en torno a cada nucleosoma. La figura 4.3 es una representación muy simplificada de la estructura de un nucleosoma, en la que la tira blanca es el ADN y las líneas curvas grises son las colas de la histona.

Si hubiésemos leído algo sobre las histonas tan solo quince años atrás probablemente las habríamos descrito como “paquetes de proteínas” y lo habríamos dejado así. Es cierto que el ADN tiene que estar empaquetado. El núcleo de una célula tiene normalmente unas 10 micras de diámetro –una micra es una centésima de milímetro– y si el ADN de una célula se dejase completamente suelto y desenrollado se extendería unos 2 metros. El ADN está apretadamente enrollado en torno a los octámeros de histonas y estos están apilados unos sobre otros.

Determinadas regiones de nuestros cromosomas tienen una forma extrema de este tipo de estructura casi todo el tiempo. Estas tienden a ser regiones que realmente no codifcan ningún gen. Son regiones estructurales como los extremos de los cromosomas, o áreas que son importantes para separar unos cromosomas de otros una vez que el ADN ha sido duplicado por el proceso de división celular.

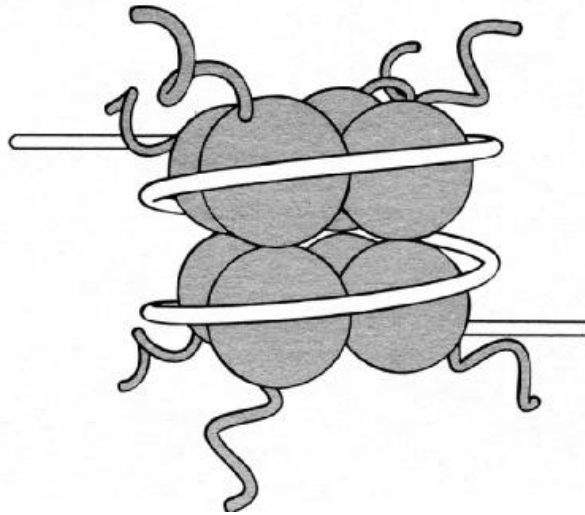

Figura 4.3: El octámero de histonas (2 moléculas de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4) formando un paquete compacto con el ADN rodeándolo, constituye la unidad básica de cromatina llamada nucleosoma.

Las regiones del ADN que están realmente muy metiladas también tienen esta estructura hipercondensada, y la metilación es muy importante a la hora de establecer esta configuración. Este es uno de los mecanismos utilizados para mantener desactivados a determinados genes durante décadas en células longevas como las neuronas.

Pero ¿qué hay de las regiones que no están tan apretadas y en las que hay genes que se activan o que tienen el potencial para activarse? Ahí es donde las histonas entran realmente en juego. El papel de las histonas es mucho más importante que el hecho de hacer de carrete molecular para que el ADN se enrolle. Si la metilación del ADN representa las anotaciones casi permanentes añadidas a nuestro guión de Romeo y Julieta, las modificaciones de las histonas son las anotaciones más provisionales. Son como marcas de lápiz que sobreviven a unas cuantas sesiones de fotocopiado pero que finalmente desaparecen. Pueden ser incluso más efímeras, como los post-its que se utilizan solo temporalmente.

Un número considerable de avances en este campo han salido del laboratorio del profesor David Allis en la Rockefeller University de Nueva York. El profesor Allis es el típico norteamericano esbelto, pulcro y bien rasurado que aparenta muchos años menos de los sesenta que ya tiene, y es extraordinariamente popular entre sus colegas. Como muchos epigenetistas empezó su carrera en el campo de la biología del desarrollo. Y del mismo modo que Adrian Bird y John Gurdon antes que él, vive su reputación estelar en el campo de la epigenética sin darle demasiada importancia. En una notable serie de

artículos publicados en 1996, él y sus colegas mostraron que las histonas eran químicamente modificadas en las células y que esta modificación incrementaba la expresión de los genes cerca de un nucleosoma específico modificado[8].

La modificación de las histonas identificada por David Allis se bautizó como acetilación. La acetilación es la adición de un grupo químico llamado acetilo, en este caso a un aminoácido concreto llamado lisina en la cola de una de las histonas. La figura 4.4 muestra las estructuras de la lisina y de la acetil-lisina, y una vez más podemos ver que la modificación es relativamente pequeña. Del mismo modo que la metilación del ADN, la acetilación de la lisina es un mecanismo epigenético para alterar la expresión de los genes que no cambia la secuencia genética subyacente.

Así pues, en 1996 la historia de este proceso se podía contar de un modo bastante sencillo. Pero la expresión de los genes raramente es como un conmutador on/off; se parece mucho más al dial del volumen de una radio tradicional. Por ello no fue nada sorprendente descubrir que había más de una modificación de las histonas. De hecho, desde el trabajo inicial de David Allis se han descubierto más de 50 modificaciones epigenéticas de las histonas, tanto por el propio Ellis como por un montón de laboratorios[9]. Todas estas modificaciones alteran la expresión de los genes, pero no siempre del mismo modo. Algunas modificaciones de las histonas incrementan la expresión de los genes y otras la reducen. La pauta de modificaciones se conoce como un código de histonas[10]. El problema al que tienen que hacer frente los epigenetistas es que se trata de un código extraordinariamente difícil de descifrar.

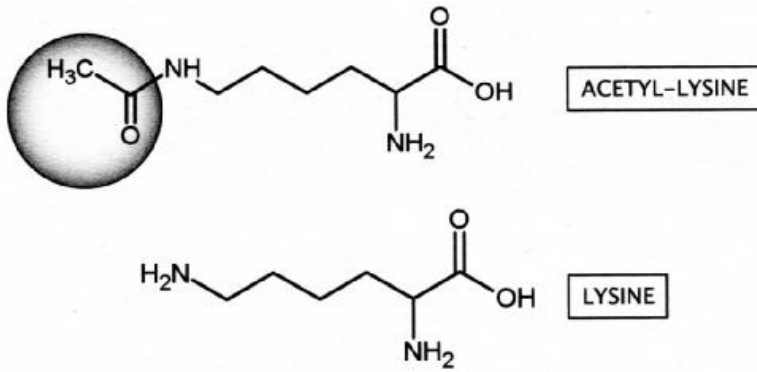

Figura 4.4: Estructuras químicas del aminoácido lisina y su forma epigenéticamente modificada, la acetil-lisina. C: Carbono; H: Hidrógeno; N: Nitrógeno; O: Oxígeno. Para mayor simplicidad, algunos átomos de carbono no se muestran explícitamente, pero están presentes allí donde hay un enlace de dos líneas.

Imaginemos a un cromosoma como el tronco de un árbol de Navidad muy grande. Las ramas que salen del tronco son las colas de las histonas y estas pueden decorarse con modificaciones epigenéticas. Cogemos las bolas de adorno de color morado y ponemos una, dos o tres en algunas de las ramas. También tenemos carámbanos de hielo de color verde para decorar y podemos poner uno o dos de ellos en algunas ramas, en algunas de las cuales ya habremos puesto bolas de adorno. Cogemos ahora unas cuantas estrellas rojas, pero nos dicen que no podemos ponerlas en una rama si la rama adyacente contiene bolas moradas. No puede haber copos de nieve dorados y carámbanos verdes en la misma rama. Y así sucesivamente, con reglas y pautas cada vez más complejas. Finalmente, hemos usado todos los adornos y rodeamos el árbol con una tira de pequeñas bombillas. Las bombillas representan genes individuales. Gracias a una pieza mágica de programación, el brillo de cada bombilla viene determinado por la configuración exacta de los adornos que tiene alrededor. Lo más probable es que tengamos que hacer realmente muchos esfuerzos para predecir el brillo de la mayoría de las bombillas porque la configuración de los adornos es muy complicada.

Así es como están actualmente los científicos por lo que respecta a predecir cómo influyen las diversas combinaciones de modificaciones de las histonas en la expresión de los genes. En muchos casos está razonablemente claro qué es lo que pueden hacer determinadas modificaciones individuales, pero todavía no es posible hacer predicciones exactas para las combinaciones más complejas.

Se están haciendo importantes esfuerzos para tratar de entender este código, y hay muchos laboratorios en todo el mundo colaborando o

compitiendo en el uso de las tecnologías más rápidas y más complejas para abordar este problema. El motivo es que si bien todavía no somos capaces de leer el código adecuadamente, conocemos lo suficiente acerca del mismo para saber que es extraordinariamente importante.

Construir una ratonera más eficaz

Algunas de las pruebas fundamentales proceden del campo de la biología del desarrollo, el campo del que han surgido tantos grandes investigadores de la epigenética. Como ya hemos explicado, la célula individual que es el zigoto se divide y muy rápidamente las células hijas empiezan a realizar funciones discretas. El primer acontecimiento a destacar es que las células del embrión temprano se dividen entre la masa celular interior (ICM) y el trofoectodermo. Las células de la ICM en particular empiezan a diferenciarse para formar un número cada vez mayor de diferentes tipos de células. Este recorrido de las células por el paisaje epigenético es, en gran medida, un sistema que se autoperpetúa.

El concepto fundamental a retener en esta fase es la forma en que se suceden una a otra las diversas oleadas de expresión de los genes y de las modificaciones epigenéticas. Una analogía útil para entender esto es el juego Mousetrap [La ratonera], introducido a comienzos de los años 1960 y todavía en venta hoy. Los jugadores tienen que construir una ratonera descabelladamente compleja en el transcurso del juego. La ratonera se activa en uno de sus extremos mediante el simple acto de soltar una bola. La bola pasa por y a través de toda clase de artilugios, incluidos un tobogán, una bota que da patadas, un tramo de escalera y un hombre saltando desde un trampolín. Si las piezas se sitúan como es debido, la ridícula cascada opera perfectamente y el ratón de juguete cae en la trampa. Si solo una de las piezas está levemente mal alineada, todo el tinglado se detiene dando una sacudida y la trampa no funciona.

El embrión en desarrollo es como el juego Mousetrap. El zigoto está precargado con determinadas proteínas procedentes principalmente del citoplasma del óvulo. Estas proteínas se introducen en el núcleo, se ligan a unos genes-objetivo a los que llamaremos botas (en honor a Mousetrap) y regulan su expresión. También atraen unas cuantas enzimas epigenéticas selectas a los genes bota. Estas enzimas epigenéticas también pueden haber sido “donadas” por el citoplasma del óvulo y provocan unas modificaciones más duraderas al ADN y a las histonas de la cromatina, influyendo también en cómo se activan y desactivan estos genes bota. Las proteínas bota se ligan a los genes

saltadores de trampolín y los activan. Algunos de estos genes saltadores de trampolín pueden codificar por sí mismos enzimas epigenéticas que forman complejos en miembros de la familia de genes tobogán, y asi sucesivamente. Las proteínas genéticas y epigenéticas trabajan conjuntamente en una sucesión metódicamente perfecta, igual que los acontecimientos en Mousetrap una vez soltada la bola. A veces una célula expresará un poco más o un poco menos de un factor clave, un factor cuya expresión dependa de un umbral delicadamente equilibrado. Esto tiene el potencial para alterar el camino del desarrollo que toman las células, como si se hubiesen conectado veinte juegos de Mousetrap. Ligeras desviaciones en la forma como se han encajado las piezas, o en cómo ha rodado la bola en momentos críticos, hacen que se dispare una trampa y no otra.

Los nombres de nuestra analogía son inventados, pero podemos aplicarlos a un caso real. Una de las proteínas clave en las fases más tempranas del desarrollo embrionario es Oct4. La proteína Oct4 se liga a ciertos genes clave y también atrae a una enzima epigenética específica. Esta enzima modifica a la cromatina y altera la regulación del gen. Tanto Oct4 como la enzima epigenética con la que colabora son esenciales para el desarrollo temprano del embrión. Si alguna de las dos está ausente, el zigoto no puede siquiera desarrollarse hasta la fase de la creación de una ICM.

Las pautas de expresión genética en el embrión temprano se realimentan finalmente ellas mismas. Cuando determinadas proteínas se expresan pueden unirse al promotor Oct4 y desactivar la expresión de este gen. En circunstancias normales, las células somáticas simplemente no expresan Oct4. Sería demasiado peligroso que lo hicieran porque Oct4 podría perturbar las pautas normales de expresión genética en las células diferenciadas y convertirlas en algo más parecido a células madre.

Esto fue exactamente lo que hizo Shinya Yamanaka cuando utilizó Oct4 como factor reprogramador. Creando artificialmente niveles muy elevados de Oct4 en células diferenciadas pudo “engañar” a las células haciéndolas actuar como células del desarrollo tempranas. Incluso las modificaciones epigenéticas fueron reiniciadas –así es de poderoso este gen.

El desarrollo normal ha producido pruebas importantes de la función que tienen las modificaciones epigenéticas en el control del destino de las células. Casos en los que el desarrollo se tuerce también nos han mostrado lo importante que puede ser la epigenética. Por ejemplo, un artículo publicado el año 2010 en la revista Nature Genetics identificó las mutaciones que causan una rara enfermedad llamada el síndrome de Kabuki. El síndrome de Kabuki es un complejo trastorno del desarrollo con una serie de síntomas entre los que se

encuentran retraso mental, baja estatura, anormalidades faciales y paladar hendido. El artículo mostraba que el síndrome de Kabuki lo causaban unas mutaciones en un gen llamado MLL2[11]. La proteína MLL2 es un escritor epigenético que añade grupos metilo a un aminoácido lisina específico en la posición 4 de la histona H3. Los pacientes con esta mutación son incapaces de escribir como es debido su código epigenético, y esto es lo que causa los síntomas de la enfermedad.

Las enfermedades humanas también pueden estar causadas por mutaciones en las enzimas que eliminan las modificaciones epigenéticas, es decir, por los "borradores" del código epigenético. Las mutaciones en un gen llamado PHF8, que elimina grupos metilo de una lisina en la posición 20 de la histona H3, provocan un síndrome de retraso mental y paladar hendido[12]. En estos casos, las células del paciente hacen las modificaciones epigenéticas sin problemas pero no las eliminan adecuadamente.

Es interesante observar que si bien las proteínas MLL2 y PHF8 tienen roles diferentes, los síntomas clínicos causados por las mutaciones en estos genes tienen solapamientos en su presentación. Ambas provocan retraso mental y paladar hendido. Clásicamente se considera que estos dos síntomas reflejan problemas durante el desarrollo. Los senderos epigenéticos son importantes toda la vida, pero parecen ser particularmente significativos durante el desarrollo.

Además de estos escritores y borradores de histonas hay más de cien proteínas que actúan como "lectores" de este código de la histona ligándose a unos marcadores epigenéticos. Estos lectores atraen a otras proteínas y construyen complejos que activan o desactivan la expresión de los genes. Esto es parecido a la forma en que MeCP2 contribuye a desactivar la expresión de los genes que transportan la metilación del ADN.

Las modificaciones de la histona son diferentes de la metilación del ADN de una forma muy importante. La metilación del ADN es un cambio epigenético muy estable. Una vez que una región del ADN ha sido completamente metilada tenderá a permanecer metilada en muchas condiciones. Es por ello que la modificación epigenética es tan importante para mantener a las neuronas como neuronas, y para que no nos salgan dientes en los ojos. Aunque la metilación del ADN puede eliminarse en las células, esto solo se produce normalmente en circunstancias muy concretas y muy poco habituales.

La mayoría de modificaciones de las histonas son mucho más plásticas. Una modificación concreta puede ponerse en una histona en un gen particular, borrarse y volverse a poner. Esto responde a toda clase de estímulos desde el exterior del núcleo de la célula. Los estímulos pueden variar mucho. En algunos tipos de células el código

de la histona puede cambiar en respuesta a las hormonas. Entre estas están la insulina que señala a las células musculares, o estrógenos que afectan a las células del pecho durante el ciclo menstrual. En el cerebro el código de la histona puede cambiar en respuesta a drogas adictivas como la cocaína, mientras que en las células que revisten el intestino la pauta de modificaciones epigenéticas cambiará en función de la cantidad de ácidos grasos producidos por las bacterias que hay en nuestros intestinos. Estos cambios en el código de la histona son una de las formas fundamentales mediante las cuales la crianza (el entorno) interactúa con la naturaleza (nuestros genes) para crear la complejidad de todos los organismos superiores de la Tierra.

Las modificaciones de las histonas también permiten a las células "probar" pautas particulares de expresión de los genes, especialmente durante el desarrollo. Los genes son temporalmente desactivados cuando modificaciones de las histonas represoras (las que reducen la expresión de los genes) se establecen en las histonas próximas a dichos genes. Si hay alguna ventaja para la célula en la desactivación de dichos genes, las modificaciones de las histonas pueden durar lo suficiente para llevar a la metilación del ADN. Las modificaciones de las histonas atraen proteínas lectoras que construyen complejos de otras proteínas en el nucleosoma. En algunos casos los complejos pueden incluir DNMT3A o DNMT3B, dos de las enzimas que depositan grupos metilo en los pares CpG del ADN. En estas circunstancias, la DNMT3A o la 3B pueden "alcanzar" a la histona desde el complejo y metilar al ADN adyacente. Si se produce una metilación suficiente del ADN, la expresión del gen es silenciada. En circunstancias extremas toda la región del cromosoma puede quedar hipercompactada e inactivada durante varias divisiones celulares, o durante décadas en aquellas células que no se dividen, como las neuronas.

¿Por qué la evolución ha favorecido la aparición de estas complejas pautas de modificación de las histonas para regular la expresión de los genes? Los sistemas parecen particularmente complejos cuando se los contrasta con los efectos realmente de todo-o-nada de la metilación del ADN. Uno de los motivos es probablemente que la complejidad permite un ajuste fino sofisticado de la expresión de los genes. Debido a ello, las células y los organismos pueden adaptar apropiadamente la expresión de sus genes en respuesta a los cambios que se producen en su entorno, como la disponibilidad de nutrientes o la exposición a diversos virus. Pero como veremos en el próximo capítulo, este ajuste fino puede tener unas consecuencias verdaderamente muy extrañas.

1. Kruczek y Doerfler (1982), EMBO J. 1: 409-14.
2. Bird et al. (1985), Cell 40: 91-99.
3. Lewis et al. (1992), Cell 69: 905-14.
4. Nan et al. (1998), Nature 393: 386-9.

5. Para una revisión reciente de las acciones de MecCP2 véase Adkins y George (2011), Biochem Cell Biol. 89: 1-11.
6. Guy et al. (2007), Science 315: 1.143-7.
7. http://www.youtube.com/watch?v=RyAvKGmAE1Q&feature=related
8. Las publicaciones más importante del laboratorio Allis en 1996 fueron: Brownell et al. (1996), Cell 85 4: 843-51; Vettese-Dadey et al. (1996), EMBO J. 15: 2.508-18; Kuo et al. (1996), Nature 383: 269-72.
9. Una revisión útil por parte de uno de los investigadores más destacados en este campo es: Kouzarides, T. (2007) Cell 128: 693-705.
10. Jenuwein y Allis (2001), Science 293: 1.074-80.
11. Ng et al. (2010), Nat Genet. 42: 790-3.
12. Laumonnier et al. (2005), J Med Genet. 42: 780-6.

Capítulo 5
¿Por qué los gemelos idénticos no son realmente idénticos?

Hay dos cosas en la vida para las que no estamos nunca preparados: los gemelos.
Josh Billings

Durante milenios los gemelos idénticos han sido una fuente de fascinación en las culturas humanas, y esta fascinación ha continuado hasta hoy mismo. Basta tomar la literatura europea occidental como fuente; en ella encontramos a los gemelos Menecmo y Sosicles en una obra de Plauto del año 200 a.C.; la recreación de la misma historia por Shakespeare en *La comedia de los errores*, escrita hacia 1590; Tweedledum y Tweedledee en la obra de Lewis Carroll *Alicia a través del espejo*, escrita en 1871; hasta los gemelos Weasley en las novelas de *Harry Potter* de J. K. Rowling. Hay algo inherentemente intrigante en dos personas que parecen exactamente la misma.

Pero hay algo que nos interesa a todos incluso más que las extraordinarias semejanzas de los gemelos idénticos, y esto es cuando podemos ver las diferencias. Es un recurso que ha sido repetidamente utilizado en el arte, desde Frederic y Hugo en la obra de Jean Anouilh *Anillo alrededor de la Luna*, hasta Beverley y Elliott Mantle en *Dead Ringers* [Mortalmente parecidos] de David Cronenberg. Llevando esto al extremo podríamos incluso citar al Dr. Jekyll y a su *alter ego* Mr. Hyde, los "gemelos malvados" definitivos. Las diferencias entre gemelos idénticos han ciertamente capturado la imaginación de las personas creativas en todas las ramas del arte, y también han cautivado completamente al mundo de la ciencia.

El término científico para los gemelos idénticos es el de gemelos monozigóticos (MZ). Se llama así a los gemelos idénticos porque ambos proceden del mismo zigoto formado por la unión de un óvulo y un espermatozoide. En el caso de los gemelos MZ la masa celular interior del blastocisto se divide en dos durante las primeras divisiones celulares, como si cortáramos un *donut* por la mitad, y da lugar a dos embriones. Y estos embriones son *genéticamente* idénticos.

Esta división de la masa celular interior para formar dos embriones separados es generalmente considerada un acontecimiento aleatorio. Esto es consistente con el hecho de que la frecuencia de gemelos monozigóticos es más o menos la misma en todas las poblaciones

humanas, y con el hecho de que la propensión a tener gemelos idénticos no va por familias. Tendemos a pensar en los gemelos MZ como muy raros, pero en realidad no lo son. Aproximadamente uno de cada 250 embarazos que llegan a término acaba con el nacimiento de un par de gemelos monozigóticos, y actualmente en el mundo hay unos diez millones de pares de gemelos idénticos.

Los gemelos MZ son particularmente fascinantes porque nos ayudan a determinar hasta qué punto la genética es la fuerza impulsora de determinados acontecimientos de la vida como algunas enfermedades particulares. Básicamente nos permiten explorar matemáticamente la conexión existente entre las secuencias de nuestros genes (el genotipo) y la forma como somos (el fenotipo), tanto por lo que respecta a la altura, la salud, las pecas que tenemos o cualquier otra cosa que queramos medir. Esto se hace calculando con qué frecuencia los dos gemelos de un par sufren la misma enfermedad. La expresión técnica para esto es el "índice de concordancia".

La acondroplasia, una forma relativamente común de enanismo, es un ejemplo de defecto del crecimiento en el que los gemelos MZ se ven casi invariablemente afectados del mismo modo. Si uno de los gemelos tiene acondroplasia, también la tiene el otro. Se dice que la enfermedad tiene un índice de concordancia del cien por cien. Esto no tiene nada de sorprendente, ya que la acondroplasia la causa una mutación genética concreta. Suponiendo que la mutación estaba presente o bien en el óvulo o bien en el espermatozoide que se unieron para formar el zigoto, todas las células hijas que forman la masa celular interior, y en definitiva los dos embriones, contendrán la mutación.

Sin embargo, son relativamente pocas las enfermedades que tienen un índice de concordancia del cien por cien, puesto que la mayoría no las causa una sola mutación de un gen clave. Esto crea el problema de cómo determinar si la genética desempeña un papel, y en caso afirmativo, de cuál es la importancia de ese papel. Ahí es donde los estudios de gemelos se han vuelto tan valiosos. Si estudiamos grandes grupos de gemelos monozigóticos podemos determinar qué porcentaje de ellos es concordante o discordante para una determinada enfermedad. Si uno de los gemelos sufre una enfermedad, ¿tiene también el otro tendencia a desarrollarla?

La figura 5.1 es un gráfico que muestra los índices de concordancia de la esquizofrenia. Este gráfico muestra que cuanto más estrechamente relacionados estamos con alguien que sufre la enfermedad, más probable es que la desarrollemos nosotros mismos. Las partes más importantes a observar del gráfico son las dos barras de la parte inferior, las relativas a los gemelos. De este modo podemos comparar los índices de concordancia para los gemelos idénticos y no

idénticos (gemelos fraternos o mellizos). Los gemelos no idénticos comparten el mismo entorno de desarrollo (el mismo útero), pero genéticamente no son más semejantes que cualquier otro par de hermanos, pues se forman a partir de dos zigotos separados como consecuencia de la fertilización de dos óvulos. La comparación entre los dos tipos de gemelos es importante porque, hablando en general, es muy probable que los dos gemelos de un par (tanto idénticos como no idénticos) hayan compartido entornos bastante similares. Si la esquizofrenia estuviese causada principalmente por factores medioambientales, sería de esperar que los índices de concordancia de la enfermedad fuesen muy parecidos en el caso de los gemelos idénticos y en el de los gemelos fraternos. Pero lo que vemos es que, en los gemelos no idénticos, si uno de ellos desarrolla esquizofrenia, el otro tiene un 17 por ciento de probabilidades de hacer lo mismo. Pero en los gemelos monozigóticos este riesgo sube hasta casi el 50 por ciento. La magnitud de esta diferencia nos dice que hay un componente genético en la esquizofrenia.

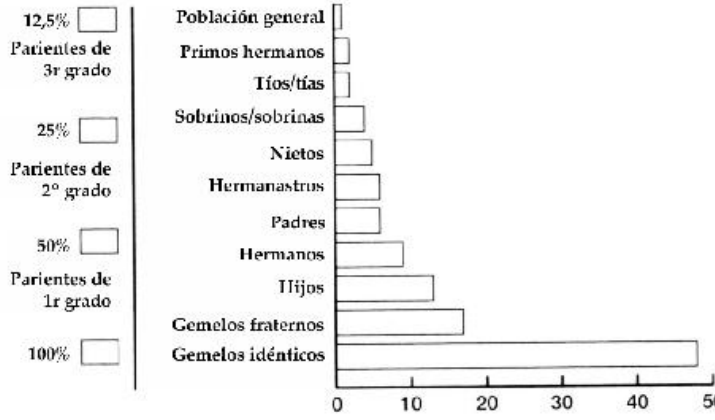

Figura 5.1: Índices de concordancia de la esquizofrenia. Cuanto más genéticamente relacionados están dos individuos, mayor es la probabilidad de que si uno de ellos tiene la enfermedad, también el otro la desarrolle. Sin embargo, incluso en el caso de los gemelos monozigóticos genéticamente idénticos, el índice de concordancia de la esquizofrenia no es del cien por cien. Datos extraídos de The Surgeon General's Report on Mental Health http://www.surgeongeneral.gov/library/mentalhealth/chapter4/sec4_1.html#etiology.

Estudios similares han mostrado que hay también un componente genético sustancial en un número significativo de otras enfermedades humanas, incluidas la esclerosis múltiple, el trastorno bipolar, el lupus eritematoso sistémico y el asma. Esto ha sido realmente útil para comprender la importancia de la susceptibilidad genética a enfermedades complejas.

Pero en muchos sentidos es la otra cara de la cuestión lo más interesante. No son los gemelos MZ que desarrollan una misma enfermedad lo interesante, sino los que tienen historias muy diferentes –uno de ellos esquizofrénico paranoide, por ejemplo, y el otro mentalmente muy sano– los que constituyen un enigma científico más intrigante. ¿Por qué dos individuos genéticamente idénticos, que en muchos casos han experimentado entornos muy parecidos, tienen unos fenotipos tan variables? Igualmente, ¿por qué es tan raro que los dos gemelos MZ de un par desarrollen diabetes del tipo 1? ¿Qué es, aparte del código genético, lo que gobierna estos historiales clínicos diferentes?

La cuña que introduce la epigenética entre los dos gemelos

Una posible explicación sería que, de un modo bastante aleatorio, los dos gemelos con esquizofrenia hubiesen desarrollado espontáneamente mutaciones en los genes de determinadas células, por ejemplo en el cerebro. Esto podría darse si la maquinaria de replicación del ADN hubiese fallado en algún momento durante el desarrollo cerebral. Estos cambios podrían incrementar la susceptibilidad de uno de ellos a este trastorno en concreto. Esto es teóricamente posible, pero los científicos no han sido capaces de encontrar pruebas a favor de esta teoría.

Por supuesto, la respuesta estándar ha sido siempre que la discordancia entre los gemelos se debe a diferencias medioambientales. A veces esto es obvio. Si estuviésemos estudiando la longevidad, por ejemplo, un gemelo que fuese atropellado y muerto por un autobús representaría obviamente una diferencia medioambiental. Pero este sería un caso extremo. Muchos gemelos comparten un entorno bastante similar, especialmente durante la fase temprana del desarrollo. Incluso así, es ciertamente posible que haya múltiples diferencias medioambientales sutiles que sea difícil monitorizar adecuadamente.

Pero cuando evocamos el entorno como el otro factor importante en el desarrollo de una enfermedad, se nos plantea otro problema. Queda abierta la cuestión de cómo interviene exactamente el entorno. De un modo u otro, los estímulos medioambientales –ya sean los compuestos presentes en lo que comemos, las sustancias químicas que hay en el humo de los cigarrillos, los rayos UV del Sol, los agentes contaminantes de los gases de los coches o cualquiera de los miles de moléculas y de las fuentes de radiación a las que estamos expuestos cada día –tienen que tener un impacto en nuestros genes y causar un cambio en su expresión.

La mayoría de enfermedades no infecciosas que afligen a la mayor parte de las personas tardan mucho tiempo en desarrollarse y permanecen como un problema crónico si no hay una cura disponible. Los estímulos del entorno pueden teóricamente estar afectando a los genes todo el tiempo en las células que se comportan anormalmente, llevando a la enfermedad. Pero esto parece poco probable, especialmente porque la mayoría de las enfermedades crónicas implican probablemente la interacción de múltiples estímulos con múltiples genes. Resulta difícil imaginar que todos estos estímulos estén presentes al mismo tiempo durante décadas. La alternativa es que hay un mecanismo que mantiene a las células asociadas con la enfermedad en un estado anormal, es decir, expresando los genes de forma inapropiada.

En ausencia de pruebas sustanciales a favor del rol de las

mutaciones somáticas, la epigenética es un buen candidato para este mecanismo. Esto permitiría a los genes de uno de los gemelos permanecer mal regulado causando finalmente la enfermedad. Estamos solamente al comienzo de la investigación, pero han empezado a obtenerse pruebas que sugieren que esta puede ser la explicación.

Uno de los experimentos conceptualmente más sencillos es el que consiste en analizar si las pautas de modificación de la cromatina (el epigenoma) cambian a medida que los gemelos MZ envejecen. En el caso más simple, ni siquiera necesitamos investigar esto en el contexto de la enfermedad. Podemos empezar comprobando una hipótesis mucho más simple –la de que individuos genéticamente idénticos se vuelven genéticamente no idénticos al envejecer. Si esta hipótesis es correcta, esto confirmaría la idea de que los gemelos MZ pueden variar entre sí a nivel epigenético. Esto a su vez reforzaría nuestra confianza en los avances en el examen del rol de los cambios epigenéticos en la enfermedad.

El año 2005, un equipo de investigadores dirigido por el profesor Manel Esteller, entonces en el Centro Nacional del Cáncer en Madrid, publicó un trabajo en el que examinaban este tema[1]. Realizaron algunos descubrimientos interesantes. Al examinar la cromatina de pares de niños gemelos MZ no encontraron muchas diferencias en los niveles de metilación del ADN o de la acetilación de las histonas entre los dos gemelos. Pero cuando examinaron a pares de gemelos monozigóticos adultos, de unos cincuenta años, encontraron grandes variaciones en estos niveles. Esto parecía particularmente cierto en el caso de los gemelos que habían vivido separados durante mucho tiempo.

Los resultados de este estudio eran consistentes con un modelo en el que gemelos genéticamente idénticos empezaban de un modo epigenéticamente muy similar y luego divergía a medida que envejecían. Los gemelos MZ que habían llevado vidas separadas y diferentes durante más tiempo eran aquellos en los que la probabilidad de encontrar diferencias en sus entornos era mayor. El descubrimiento de que estos eran precisamente los pares de gemelos epigenéticamente más diferentes era consistente con la idea según la cual el epigenoma (la pauta general de modificaciones epigenéticas en el genoma) refleja diferencias medioambientales.

Los niños que desayunan antes de ir a la escuela tienen más probabilidades de sacar buenas notas que los que no desayunan. Esto no significa necesariamente que un tazón de leche con cereales pueda mejorar el aprendizaje. Puede simplemente que los niños que desayunan antes de ir a la escuela sean niños cuyos padres se esfuerzan más en llevarlos cada día a la escuela puntualmente y que

les ayudan en sus estudios. De modo parecido, los datos del profesor Esteller son correlativos. Muestran que existe una relación entre las edades de los gemelos y lo diferentes que son epigenéticamente, pero no demuestran que la edad haya causado el cambio en el epigenoma. Pero al menos puede sostenerse la hipótesis.

El año 2010 un equipo dirigido por el doctor Jeffrey Craig en el Royal Children's Hospital de Melbourne también examinó la metilación del ADN en pares de gemelos idénticos y fraternos[2]. Investigaron unas cuantas regiones relativamente pequeñas del genoma con mayor detalle que el trabajo anterior de Manel Esteller. Utilizando solo muestras de pares de gemelos recién nacidos mostraron que había una cantidad sustancial de diferencias entre las pautas de metilación del ADN en los gemelos fraternos. Esto no fue nada inesperado dado que los gemelos fraternos son genéticamente no idénticos y lo lógico es que diferentes individuos tengan epigenomas diferentes. Pero, curiosamente, también encontraron que incluso los gemelos MZ diferían en sus pautas de metilación del ADN, lo que sugería que los gemelos idénticos empiezan a divergir epigenéticamente durante el desarrollo en el útero. Combinando la información de los dos trabajos, y la de otros estudios adicionales, podemos concluir que incluso los individuos genéticamente idénticos son epigenéticamente distintos en el momento de nacer, y estas diferencias epigenéticas se vuelven más pronunciadas con la edad y con la exposición a diferentes entornos.

De ratones y hombres (y mujeres)

Estos datos son consistentes con un modelo en el que los cambios epigenéticos pueden explicar al menos algunas de las razones de por qué los gemelos MZ no son fenotípicamente idénticos, pero esto implica todavía muchos supuestos, debido a que en muchos sentidos los humanos son un sistema experimental muy inadecuado. Si quisiéramos determinar el rol de la epigenética en el problema de por qué individuos genéticamente idénticos son fenotípicamente diferentes entre sí tendríamos que ser capaces de hacer lo siguiente:

1. Analizar cientos de individuos idénticos, no solo pares de ellos.
2. Manipular sus entornos de una forma totalmente controlada.
3. Transferir embriones o bebés de una madre a otra para investigar los efectos de la crianza temprana.
4. Tomar toda clase de muestras de diferentes tejidos corporales en muchos momentos diferentes en el tiempo.
5. Controlar quién se aparea con quién.

6. Llevar a cabo estudios en cuatro o cinco generaciones de individuos genéticamente idénticos.

Huelga decir que esto no es factible con seres humanos.

Esta es la razón de que los animales experimentales hayan sido tan útiles en epigenética. Permiten a los científicos abordar cuestiones realmente complejas controlando al mismo tiempo el entorno tanto como es posible hacerlo. Los datos generados en estos estudios con animales producen un conocimiento del que luego es posible inferir cosas sobre los humanos.

Puede que la comparación no sea perfecta, pero de este modo podemos aclarar una cantidad sorprendente de cuestiones biológicas fundamentales. Diversos estudios comparativos han mostrado que muchos sistemas permanecen en general estables en diferentes organismos durante períodos inconcebiblemente largos. La maquinaria epigenética de la levadura y de los humanos, por ejemplo, comparte más semejanzas que diferencias, y sin embargo el ancestro común de ambas especies tiene más de mil millones de años[3]. Así, los procesos epigenéticos son claramente muy fundamentales, y el uso de sistemas modelo puede al menos indicarnos direcciones útiles para entender la condición humana.

Respecto a la cuestión concreta que estamos examinando en este capítulo –por qué los gemelos idénticos a menudo no parecen ser idénticos– el animal que ha sido más útil es un mamífero estrechamente emparentado con nosotros, el ratón. Los linajes del ratón y de los humanos se separaron hace aproximadamente 75 millones de años[4]. El 99 por ciento de los genes que se encuentran en los ratones pueden detectarse también en los humanos, aunque en general no son absolutamente idénticos en las dos especies.

Los científicos han logrado crear variedades de ratones en las que todos los individuos son genéticamente idénticos entre sí. Esto ha sido increíblemente útil para investigar el papel de los factores no genéticos en la creación de variaciones entre individuos. En vez de solo dos individuos genéticamente idénticos es posible crear cientos o miles de ellos. La forma en que esto se hace haría ruborizarse incluso a una dinastía como la de los Ptolomeo del antiguo Egipto. Los científicos aparean a un par de ratones que son hermano y hermana. Luego aparean a un hermano y hermana de la camada resultante, y así sucesivamente. Tras repetir esto durante veinte generaciones de emparejamientos hermano-hermana, se han producido todas las variaciones genéticas en el genoma. Todos los ratones de la cepa del mismo sexo son genéticamente idénticos. En una variante aún más sofisticada del experimento, los científicos pueden tomar estos ratones genéticamente idénticos e introducir solo un cambio en su ADN. Pueden recurrir a esta forma de ingeniería genética para crear ratones

idénticos excepto por la región del ADN en la que están más interesados los experimentadores.

Un ratón de diferente color

El modelo de ratón más útil para explorar cómo los cambios epigenéticos pueden llevar a diferencias fenotípicas entre individuos genéticamente idénticos se conoce como ratón agutí. Los ratones normales tienen un pelaje rayado. Es negro en la punta, amarillo en el centro y negro de nuevo en la base. Un gen llamado agutí es esencial para crear la parte amarilla del centro, y se activa como parte del mecanismo cíclico normal en los ratones. Existe una versión mutada del gen agutí (llamada a) que nunca se activa. Los ratones que solo tienen la versión mutante a del gen agutí tienen el pelaje completamente negro. Existe también una cepa mutante particular conocida como Avy, que son las siglas de agouti viable yellow. En los ratones Avy el gen agutí está permanentemente activado y el pelaje es totalmente amarillo. Los ratones tienen dos copias del gen agutí, una heredada del padre y otra heredada de la madre. La versión Avydel gen es dominante respecto a la versión a, lo que significa que si una copia del gen es Avy y otra es a, la versión Avy“invalida” a la versión a y el pelaje de los ratones es totalmente amarillo. Todo esto se resume en la figura 5.2.

Figura 5.2: El color del pelaje de los ratones se ve afectado por la expresión del gen agutí. En los ratones normales, la proteína agutí se expresa cíclicamente y produce el patrón característicamente pinto del pelaje de los ratones. La distorsión de este patrón cíclico de expresión puede producir pelajes enteramente negros o amarillos.

Los científicos crearon una variedad de ratones que contenía una copia de Avyy una copia de a en cada célula. La nomenclatura de esta variedad es Avy/a. Dado que Avyes dominante y a recesivo, lo predecible es que los ratones tendrán un pelaje completamente amarillo. Dado que todos los ratones de la cepa son genéticamente idénticos, lo lógico sería que todos tuvieran el mismo aspecto. Pero no lo tienen. Algunos tienen el pelaje amarillo, otros el clásico aspecto de ratón de pelaje listado, y otros tienen todas las coloraciones intermedias, como puede verse en la figura 5.3.

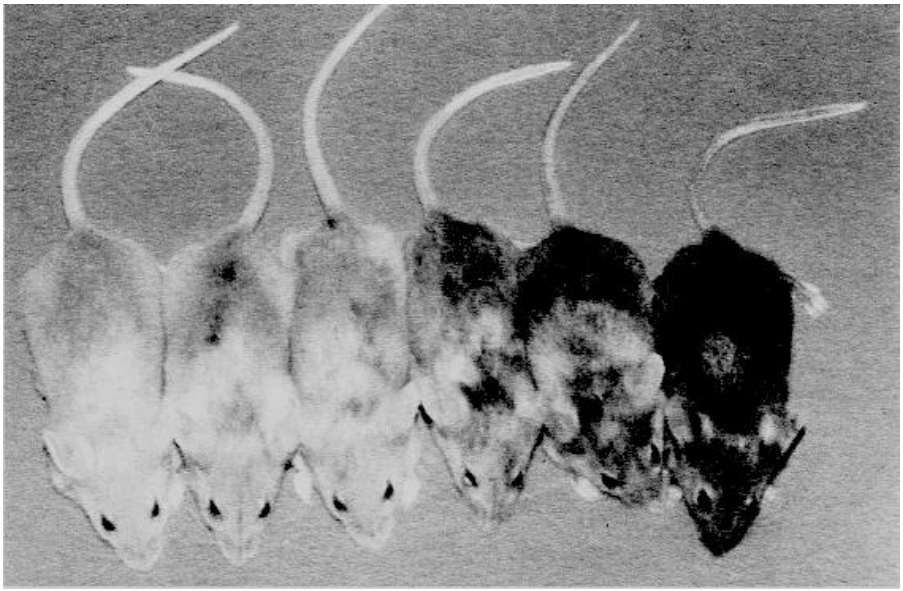

Figura 5.3: Ratones genéticamente idénticos mostrando la medida en que puede variar el color de su pelaje en función de la expresión de la proteína agutí. Foto reproducida con permiso de la profesora Emma Whitelaw.

Esto es realmente extraño, dado que genéticamente todos los ratones son el mismo ratón. Todos tienen el mismo código de ADN. Podría argumentarse que tal vez las diferencias en el color del pelaje se deben a razones ambientales, pero las condiciones del laboratorio están tan estandarizadas que esto es improbable. También es improbable porque estas diferencias pueden observarse en ratones de la misma camada. Lo lógico es que los ratones de una misma camada tengan entornos muy similares.

Por supuesto, la gracia de trabajar con ratones, y especialmente con cepas muy endogámicas, es que resulta relativamente fácil llevar a cabo detallados estudios genéticos y epigenéticos, especialmente cuando ya tenemos una idea razonable de dónde hemos de buscar. En este caso, la región a examinar era la del gen *agutí*.

Los genetistas sabían que el fenotipo amarillo lo causaban los ratones de pelaje amarillo con el gen A^{vy}. Se había insertado un fragmento de ADN en el cromosoma del ratón justo antes del gen agutí. Este fragmento de ADN se conoce como retrotransposón, y es una de estas secuencias de ADN que no codifican proteínas, sino un fragmento anómalo de ARN. La expresión de este fragmento de ARN perturba el control normal del gen agutí y lo mantiene continuamente activado. Y esta es la razón de que el pelaje de los ratones A^{vy} sea amarillo en vez de listado.

Esto todavía no contesta la pregunta de por qué los ratones A^{vy}/a genéticamente idénticos tienen un color de pelaje variable. La

respuesta la tiene la epigenética. En algunos ratones A^{vy}/a las secuencias en el retrotransposón ADN están muy metiladas. Como vimos en el capítulo anterior, este tipo de metilación del ADN desactiva la expresión del gen. El retrotransposón ya no expresa el ARN anómalo que perturbó la transcripción del gen agutí. Estos ratones eran los únicos con un pelaje listado normal. En otros ratones A^{vy}/a genéticamente idénticos el retrotransposón no estaba metilado. Producía el ARN problemático que perturbaba la transcripción del gen agutí activándolo continuamente, de modo que los ratones eran amarillos. Los ratones con unos niveles intermedios de metilación del retrotransposón también tenían unos niveles intermedios de pelaje amarillo. Este modelo se muestra en la figura 5.4.

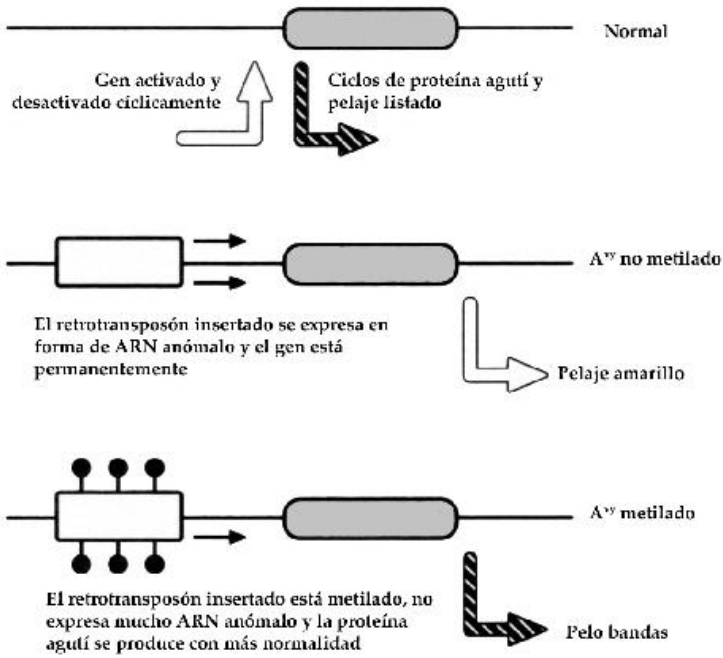

Figura 5.4: Las variaciones en la metilación del ADN (representada por los círculos negros) influyen en la expresión de un retrotransposón. La variación en la expresión del retrotransposón afecta a su vez a la expresión del gen agutí, produciendo una variabilidad en el color del pelaje entre animales genéticamente idénticos.

Aquí, la metilación del ADN funciona efectivamente como un potenciómetro. Cuando el retrotransposón no está metilado, brilla en toda su extensión, produciendo montones de ARN anómalo. Cuanto más metilado está el retrotransposón, más se reduce su expresión. El ratón agutí proporciona un ejemplo muy claro de cómo la modificación epigenética, en este caso la metilación del ADN, puede hacer que individuos genéticamente idénticos tengan aspectos fenotípicamente diferentes. Sin embargo, existe siempre el temor de que el agutí sea un caso especial, y es probable que este sea un mecanismo poco común. Esto es especialmente preocupante porque se ha demostrado que es muy difícil encontrar un gen *agutí* en humanos – parece estar entre ese 1 por ciento de genes que no compartimos con nuestros primos ratones.

Hay otra alteración interesante en algunos ratones que hace que tengan la cola enroscada. Se conoce como Axin(Fu) y también demuestra la extrema variabilidad entre individuos genéticamente idénticos. Se ha demostrado que este es otro ejemplo en el que la variabilidad la causan diferentes niveles de metilación del ADN en un retrotransposón en diferentes animales, igual que en el ratón agutí.

Esto es alentador porque sugiere que este mecanismo no es una

excepción, pero el hecho de tener la cola enroscada no es un fenotipo que tenga que preocupar al humano medio. Hay sin embargo otra cosa que sí puede llegar a preocuparnos más: el peso. No todos los ratones genéticamente idénticos tienen el mismo peso corporal.

Por mucho que los científicos controlen el entorno de los ratones, y especialmente su acceso a la comida, los ratones idénticos de cepas endogámicas no tienen todos el mismo peso corporal. Experimentos llevados a cabo durante años han puesto de manifiesto que solamente entre un 20 y un 30 por ciento de la variación en el peso corporal puede atribuirse al entorno post-natal. Esto plantea la cuestión de qué es lo que causa el otro 70-80 por ciento de variación[5]. Dado que no es la genética (porque todos los ratones son idénticos) ni el entorno, tiene que haber otra fuente de variación.

El año 2010, la profesora Emma Whitelaw, una experta y entusiasta genetista que trabaja con ratones en el Instituto Queensland de Investigación Médica, publicó un trabajo fascinante. Partiendo de una cepa endogámica de ratones los manipuló genéticamente para crear subgrupos de animales genéticamente idénticos al grupo original pero que solo expresaban la mitad de los niveles normales de una proteína epigenética determinada. Llevó a cabo la manipulación genética de manera independiente en varios ratones, para poder crear grupos separados de animales, cada uno de los cuales con una mutación diferente en los genes que codificaban las proteínas epigenéticas.

Cuando la profesora Whitelaw analizó los pesos corporales de varios ratones normales o con las mutaciones, se puso de manifiesto un dato interesante. En un grupo de ratones endogámicos normales, la mayoría de animales tenían un peso corporal parecido, dentro de los márgenes que se daban en otros estudios. En los ratones con niveles bajos de una proteína epigenética determinada, se daba una mayor variabilidad en los pesos corporales dentro del grupo. Otros experimentos también publicados en ese mismo trabajo evaluaban los efectos de una reducción en la expresión de estas proteínas epigenéticas. Esta reducción estaba relacionada con los cambios en los niveles de expresión de diversos genes implicados en el metabolismo[6], y con una mayor variabilidad en esta expresión. Dicho de otro modo, las proteínas epigenéticas ejercían un cierto control sobre la expresión de otros genes, tal como era de esperar.

Emma Whitelaw puso a prueba varias proteínas epigenéticas en su sistema y encontró que solo unas cuantas de ellas causaban la variación en el peso corporal. Una de las proteínas que producía este efecto era Dnmt3a, que es una de las enzimas que transfiere grupos metilo al ADN para desactivar genes. La otra proteína epigenética que causaba un aumento de variabilidad en el peso corporal era la llamada Trim28. Trim28 forma un complejo con otras proteínas epigenéticas y

juntas añaden modificaciones específicas a las histonas. Estas modificaciones regulan a la baja la expresión de los genes que están cerca de las histonas modificadas y se conocen como marcas o modificaciones represoras de las histonas. Las regiones del genoma que tienen muchas de estas marcas represoras en sus histonas tienden a metilarse en su ADN, por lo que es posible que Trim28 sea importante a la hora de crear un entorno adecuado para la metilación del ADN.

Estos experimentos sugerían que determinadas proteínas epigenéticas actuaban como una especie de campo amortiguador. El ADN "desnudo" es más bien propenso a activarse de un modo algo aleatorio, y el efecto general es como tener mucho ruido de fondo en nuestras células. Este fenómeno se conoce como "ruido transcripcional". Las proteínas epigenéticas actúan reduciendo el volumen de este ruido aleatorio. Lo hacen cubriendo a las histonas con modificaciones que reducen la expresión de los genes. Es muy probable que diferentes proteínas epigenéticas sean importantes para suprimir diferentes genes en algunos tejidos más que en otros.

Es obvio que esta supresión no es total. Si lo fuera, todos los ratones endogámicos serían idénticos en todos los aspectos de su fenotipo, y sabemos que este no es el caso. Hay diferencias de peso corporal incluso en las cepas endogámicas, solo que hay todavía más en los ratones con los niveles reducidos de proteínas epigenéticas.

Este sofisticado equilibrio por medio del cual las proteínas epigenéticas amortiguan el ruido transcripcional sin suprimir enteramente la expresión de los genes, es una especie de compromiso celular. Deja a las células con la suficiente flexibilidad de expresión de los genes para poder responder a nuevas señales –ya sean estas hormonas o nutrientes, agentes contaminantes o rayos solares– pero sin que los genes tengan que estar constantemente preparados para activarse sin ningún motivo que lo justifique. La epigenética permite a las células realizar el difícil compromiso entre convertirse en diferentes tipos de célula con una variedad de funciones (y seguir siéndolo), sin quedarse atrapadas en un solo patrón de expresión genética que las volvería incapaces de responder a los cambios que se producen en su entorno.

Algo que es cada vez más claro es que el desarrollo temprano es un período clave durante el cual se establece por vez primera este control del ruido transcripcional. Después de todo, solo una proporción muy pequeña de la variación en el peso corporal de las cepas endogámicas originales podía atribuirse al entorno post-natal (solo un 20-30 por ciento). Hay un interés cada vez mayor en el papel de un fenómeno llamado "programación del desarrollo" por el que las incidencias que se producen durante el desarrollo fetal pueden tener un impacto en

toda la vida adulta, y se admite cada vez más que los mecanismos epigenéticos son los que están en la base de una gran proporción de esta programación.

Este modelo es totalmente consistente con el trabajo de Emma Whitelaw sobre los efectos de los niveles reducidos de Dnmt3a o de Trim28 en sus estudios con ratones. Los efectos en el peso corporal se hicieron evidentes cuando los ratones tenían solo tres semanas de edad. Este modelo también es consistente con el hecho de que unos niveles reducidos de Dnmt3a tuvieron como consecuencia una mayor variabilidad en el peso corporal, pero unos niveles reducidos de otra enzima relacionada con ella (Dnmt1) no produjeron ningún efecto en los experimentos de Emma Whitelaw. Dnmt3a puede añadir grupos metilo a unas regiones totalmente no metiladas del ADN, lo que significa que es la proteína responsable de establecer los patrones correctos de metilación del ADN en las células. Dnmt1 es la proteína que mantiene los patrones de metilación preestablecidos en el ADN. Según parece, el factor más importante a la hora de amortiguar la variabilidad en la expresión de los genes (al menos por lo que respecta al peso corporal) es establecer de entrada los patrones correctos de metilación del ADN.

La Hambruna Invernal Holandesa

Los científicos y los decisores políticos reconocen desde hace años la importancia que tienen una buena salud y nutrición maternal durante el embarazo para incrementar las probabilidades de que los niños nazcan con un peso adecuado y tengan un desarrollo físico normal. Recientemente se ha comprobado que si una madre no se alimenta correctamente durante el embarazo, su hijo puede tener un riesgo más elevado de tener problemas de salud no solo durante la primera infancia inmediatamente posterior al parto, sino durante décadas. Solo recientemente hemos empezado a comprender que esto se debe en parte a los efectos de la epigenética molecular, lo que tiene como consecuencia la aparición de problemas en la programación del desarrollo y defectos de por vida en la expresión de los genes y en la función celular.

Como ya hemos subrayado, hay razones éticas y logísticas muy poderosas de por qué los humanos son una especie poco apropiada para hacer experimentos. Trágicamente, unos acontecimientos históricos, terribles en su momento, han permitido crear por accidente grupos de estudio científico de los humanos. Uno de los ejemplos más famosos de esto es la llamada Hambruna Invernal Holandesa que ya

hemos mencionado en la introducción.

Este fue un período de terribles privaciones y casi inanición que tuvo lugar durante el bloqueo que impusieron los nazis sobre Holanda el último invierno de la Segunda Guerra Mundial. Veintidós mil personas murieron y la población, desesperada, se comía todo lo que podía encontrar, desde bulbos de tulipán hasta la sangre de los animales. Las espantosas privaciones que sufrió la población crearon un notable estudio científico. Los supervivientes holandeses eran un grupo bien definido de individuos, todos los cuales habían sufrido un período de desnutrición exactamente al mismo tiempo.

Uno de los primeros aspectos estudiados fue el efecto del hambre en el peso al nacer de niños que habían estado en el útero de sus madres durante la hambruna. Si una madre había estado bien alimentada en el momento de la concepción y desnutrida solo durante los últimos meses del embarazo, su hijo tenía muchas probabilidades de nacer pequeño. Si, por otro lado, la madre había sufrido desnutrición solo durante los tres primeros meses del embarazo (debido a que el niño había sido concebido hacia el final de este terrible episodio), pero luego se había alimentado bien, era probable que tuviese un hijo con un peso corporal normal. El feto había "recuperado" el peso corporal, porque la mayor parte del crecimiento de los fetos se produce en los últimos meses del embarazo.

Pero esta es la cuestión: los epidemiólogos pudieron estudiar a estos grupos de niños durante décadas y lo que descubrieron fue realmente sorprendente. Los niños que habían nacido pequeños siguieron siendo pequeños toda su vida, con unos índices de obesidad inferiores a los del resto de la población. Y de un modo todavía más inesperado, los adultos cuyas madres habían estado desnutridas solo en las primeras fases del embarazo tenían unos índices de obesidad superiores a lo normal. Informes recientes han puesto también de manifiesto una mayor incidencia de otros problemas de salud, incluidos algunos problemas de salud mental. Si las madres habían sufrido una desnutrición severa durante las primeras fases del embarazo, sus hijos tenían una probabilidad mayor de lo normal de desarrollar esquizofrenia. Esto se descubrió no solo en la cohorte de la Hambruna Invernal Holandesa, sino también en los supervivientes de la Gran Hambruna China de 1958 a 1961, en la que millones de personas murieron de inanición a consecuencia de las políticas de Mao Tse-tung. Aunque estos individuos habían parecido perfectamente sanos al nacer, algo que había sucedido durante su desarrollo en el útero les había afectado durante décadas. Y no era solo que les hubiera sucedido algo importante, era también cuándo les había sucedido. Los acontecimientos que tienen lugar durante los tres primeros meses del desarrollo, una fase en la que el feto es realmente muy pequeño,

pueden afectar a un individuo durante el resto de su vida.

Esto es completamente consistente con el modelo del programa de desarrollo y con las bases epigenéticas de este. En las primeras fases del embarazo, durante las que se desarrollan diferentes tipos de células, las proteínas epigenéticas son probablemente vitales para establecer las pautas de expresión de los genes. Pero recuérdese que nuestras células contienen miles de genes, repartidos en miles de millones de pares de bases, y que tenemos cientos de proteínas epigenéticas. Incluso en un desarrollo normal es probable que haya ligeras variaciones en la expresión de algunas de estas proteínas, y en los efectos precisos que tienen en regiones específicas del cromosoma. Un poco más de metilación del ADN aquí, un poco menos allí.

La maquinaria epigenética refuerza y luego mantiene determinados patrones de modificaciones, creando de este modo los niveles de expresión de los genes. Consiguientemente, estas fluctuaciones inicialmente pequeñas en las modificaciones de las histonas y del ADN pueden eventualmente "estabilizarse" y transmitirse a las células hijas, o mantenerse en células longevas como las neuronas, que pueden durar décadas. Debido a que el epigenoma se queda 'atascado', también pueden hacerlo los patrones de expresión genética en determinadas regiones de los cromosomas. A corto plazo, las consecuencias de esto pueden ser relativamente menores. Pero con los años todas estas pequeñas anomalías en la expresión de los genes, consecuencia de una serie levemente inapropiada de modificaciones de la cromatina, puede llevar a discapacidades funcionales cada vez más graves. Clínicamente, no reconocemos esto hasta que se pasa un umbral imperceptible y el paciente empieza a presentar síntomas.

La variación epigenética que tiene lugar en el programa de desarrollo está en la base de un proceso predominantemente aleatorio que normalmente se denomina "estocástico". Este proceso estocástico puede explicar una buena parte de la variabilidad que se desarrolla entre gemelos monozigóticos de la que hablamos al comienzo de este capítulo. Las fluctuaciones aleatorias en las modificaciones epigenéticas durante el desarrollo temprano llevan a patrones no idénticos de expresión de los genes. Estos patrones quedan epigenéticamente establecidos y se exageran con los años, hasta que eventualmente los gemelos genéticamente idénticos se vuelven fenotípicamente diferentes, a veces del modo más espectacular. Este proceso aleatorio, causado por fluctuaciones individualmente menores en la expresión de genes epigenéticos durante el desarrollo temprano, también proporciona un buen modelo para entender por qué unos ratones A^{vy}/a genéticamente idénticos pueden acabar con pelajes de colores diferentes. Esto puede ser causado por niveles aleatoriamente variables de metilación del ADN del retrotransposón A^{vy}.

Estos cambios estocásticos en el epigenoma son probablemente la razón de por qué incluso en una cepa totalmente endogámica de ratones mantenidos en condiciones completamente estándar, hay variaciones en el peso corporal. Pero una vez introducido un gran estímulo medioambiental además de esta variación estocástica, la variabilidad puede ser aún más pronunciada.

Una perturbación importante durante la primera fase del embarazo, como una fuerte reducción de la disponibilidad de comida durante la Hambruna Invernal Holandesa, altera significativamente los procesos epigenéticos que tienen lugar en las células fetales. Las células experimentan cambios metabólicos en un intento de mantener que el feto mantenga un ritmo de crecimiento lo más normal posible pese al descenso del aporte de nutrientes. Las células cambian la expresión de sus genes para compensar la mala nutrición y las pautas de expresión quedan establecidas para el futuro a causa de las modificaciones epigenéticas en los genes. Probablemente no tiene nada de sorprendente que fueran los niños cuyas madres habían estado desnutridas durante las primeras fases del embarazo, que es cuando el programa de desarrollo está en un punto crítico, los que tuvieran un riesgo superior de ser obesos de adultos. Sus células habían sido epigenéticamente programadas para aprovechar al máximo el escaso aporte de alimento. Este programa permaneció activo incluso cuando la circunstancia ambiental que lo había desencadenado –el hambre– hacía tiempo que había desaparecido.

Estudios recientes realizados sobre las pautas de metilación del ADN en supervivientes de la Hambruna Invernal Holandesa han puesto de manifiesto la existencia de cambios en genes fundamentales implicados en el metabolismo. Aunque una correlación de este tipo no prueba necesariamente que haya una relación causa-efecto, los datos son consistentes con el hecho de que la desnutrición durante el período inicial del desarrollo haya cambiado el perfil epigenético de algunos genes metabólicos fundamentales[7].

Es importante reconocer que incluso en la cohorte de la Hambruna Invernal Holandesa los efectos observados no son de todo-o-nada. No todos los individuos cuyas madres habían estado desnutridas en la fase temprana del embarazo se volvieron obesos. Cuando los científicos estudiaron la población encontraron un aumento en la probabilidad de la obesidad adulta. Esto es una vez más consistente con un modelo en el que la variabilidad epigenética aleatoria, los genotipos de los individuos y diversos aspectos medioambientales en las fases tempranas del desarrollo se combinan en una gran ecuación muy compleja y que de momento no es fácilmente descifrable.

Una desnutrición severa no es el único factor que tiene consecuencias en un feto que pueden durar toda una vida. El consumo

excesivo de alcohol durante el embarazo es una causa importante y evitable de retraso mental y otros defectos en el momento del nacimiento (síndrome del alcoholismo fetal) en el mundo occidental[8]. Emma Whitelaw utilizó el ratón agutí para investigar si el alcohol puede alterar las modificaciones epigenéticas en un modelo de ratón del síndrome del alcoholismo fetal. Como hemos visto, la expresión del gen A^{vy} es epigenéticamente controlada mediante la metilación del ADN de un retrotransposón. Cualquier estímulo que altere la metilación del ADN del retrotransposón cambia la expresión del gen A^{vy}. Esto afecta al color del pelaje. En este modelo, el color del pelaje se convierte en una "lectura" que indica cambios en las modificaciones epigenéticas.

Se dejó que unas ratonas embarazadas tuvieran libre acceso al alcohol. El color del pelaje de las crías de las madres que habían bebido alcohol se comparó con el de las crías de unas ratonas embarazadas que no habían tenido acceso al alcohol. La distribución de colores del pelaje fue diferente en los dos grupos. Y también lo fueron los niveles de metilación del ADN del retrotransposón, como se había predicho. Esto mostró que el alcohol había producido un cambio en las modificaciones epigenéticas en los ratones. La perturbación del programa de desarrollo epigenético puede producir al menos algunos de los síntomas debilitadores y duraderos del síndrome del alcoholismo fetal en aquellos niños cuyas madres habían abusado del alcohol durante su embarazo.

El bisfenol A es un compuesto que se utiliza en la manufactura de plásticos policarbonados. Si se da de comer bisfenol a ratones agutí se provoca un cambio en la distribución del color del pelaje, lo que sugiere que esta sustancia química produce efectos en el programa de desarrollo a través de mecanismos epigenéticos. El año 2011 la Unión Europea ilegalizó el uso de bisfenol A en la fabricación de biberones.

La programación temprana puede ser también uno de los motivos de que sea muy difícil identificar los efectos medioambientales que llevan a determinadas enfermedades humanas crónicas. Si estudiamos pares de gemelos monozigóticos que son discordantes para un fenotipo específico, la esclerosis múltiple por ejemplo, puede ser casi imposible identificar una causa medioambiental. Puede simplemente ser que uno de los dos gemelos del par tuviera muy mala suerte en las fluctuaciones epigenéticas aleatorias que establecen determinadas pautas fundamentales de expresión de los genes en una fase temprana de la vida. Los científicos están intentando actualmente trazar el mapa de la distribución de los cambios epigenéticos en gemelos monozigóticos concordantes y discordantes respecto a una serie de trastornos, para tratar de identificar las modificaciones del ADN o de las histonas que tienen una correlación con la presencia o ausencia de

la enfermedad.

Los niños concebidos durante la hambruna y los ratones de pelaje amarillo nos han enseñado muchas cosas acerca del desarrollo temprano y acerca de la importancia que tiene la epigenética en este proceso. Curiosamente, estos dos grupos tan distintos tienen otra cosa que enseñarnos. A comienzos del siglo XIX, Jean-Baptiste Lamarck publicó su obra más famosa, Philosophie Zoologique. Formuló la hipótesis según la cual los caracteres adquiridos pueden transmitirse de generación en generación, y de que esto dirige la evolución. Puso el ejemplo de un animal de cuello corto parecido a la jirafa que estirase constantemente el cuello para alcanzar el alimento; este animal pasaría la característica de un cuello más largo a su descendencia. Esta teoría ha sido generalmente desacreditada y en la mayor parte de los casos se ha comprobado simplemente que es errónea. Pero la cohorte de la Hambruna Invernal Holandesa y los ratones de pelaje amarillo nos han mostrado que, sorprendentemente, el herético modelo lamarckiano de la herencia puede a veces estar en lo cierto, como vamos a ver inmediatamente.

1. Fraga et al. (2005), Proc Natl Acad Sci. USA 102: 10.604-9.
2. Ollikainen et al. (2010), Human Molecular Genetics 19: 4.176-88.
3. http://www.pbs.org/wgbh/evolution/library/04/4/1_044_02.html
4. http://evolutionpages.com/Mouse%20genome%20home.htm
5. Gartner, K. (1990), Lab Animal 24: 71-7.
6. Whitelaw et al. (2010), Genome Biology.
7. Tobi et al. (2010), HMG.
8. Kaminen-Ahola et al. (2010).

Capítulo 6
Los pecados de los padres

Porque yo, el SEÑOR tu Dios, soy un Dios celoso, que castigo
la iniquidad de los padres sobre los hijos hasta la tercera y cuarta
generación de los que me aborrecen.
Éxodo, capítulo 20, versículo 5

Las *Just So Stories* publicadas por Rudyard Kipling a comienzos del siglo XX son un imaginativo conjunto de relatos sobre los orígenes. Algunos de los más famosos hacen referencia a los fenotipos de diversos animales: *Cómo obtuvo sus manchas el leopardo, El comienzo de los armadillos, Cómo obtuvo el camello su joroba*. Están escritos puramente como un entretenimiento de fantasía, pero científicamente se remontan a un siglo antes y evocan la teoría de Lamarck de la evolución de los caracteres adquiridos. Los relatos de Kipling describen cómo adquirió un animal determinado sus características físicas –el elefante su larga trompa, por ejemplo– y la implicación es que todos sus descendientes adquirieron esta característica y que por tanto todos los elefantes actuales tienen trompa.

Kipling pretendía divertirse con sus relatos, mientras que Lamarck trataba de desarrollar una teoría científica. Como todo buen científico, trató de reunir datos relevantes para su hipótesis. En uno de los más famosos ejemplos de ello, Lamarck comenta que los hijos de los herreros (un oficio muy físico) tienden a tener unos brazos más musculosos que los hijos de los tejedores (una ocupación mucho menos exigente físicamente). Lamarck interpretaba esto suponiendo que los hijos de los herreros heredaban los brazos musculosos de sus padres.

Nuestra interpretación moderna es diferente. Nosotros sabemos que un hombre cuyos genes tienden a dotarle de la habilidad de desarrollar unos brazos musculosos tendrá ventaja si se dedica a un oficio como el de herrero. Esta ocupación atraerá a quienes estén genéticamente mejor preparados para desempeñarla. Nuestra interpretación también incluye la probabilidad de que los hijos de los herreros puedan haber heredado esta tendencia genética a tener unos buenos bíceps. Finalmente, mencionaremos el hecho de que en la época en que escribía Lamarck, los niños eran utilizados

habitualmente como miembros adicionales de la mano de obra familiar. Los hijos de un herrero tenían más probabilidades que los de un tejedor de desempeñar tareas manuales relativamente pesadas desde una edad temprana, y que por tanto desarrollarían probablemente una mayor musculatura como respuesta a su entorno, igual que hacemos todos cuando hacemos pesas.

Sería un error recordar a Lamarck solo para burlarse. Ya no consideramos científicas la mayor parte de sus ideas, pero hemos de reconocer que estaba haciendo un esfuerzo genuino por abordar cuestiones importantes. Inevitablemente, y con razón, Lamarck ha sido eclipsado por Charles Darwin, el auténtico coloso de la biología del siglo XIX –en realidad, probablemente el coloso de la biología en general. El modelo de Darwin de la evolución de las especies por selección natural ha sido el marco conceptual individual más fructífero de las ciencias biológicas. Su potencia se incrementó aún más una vez conjugado con el trabajo de Mendel sobre la herencia y con nuestro conocimiento del ADN como materia prima de la herencia.

Si quisiéramos resumir un siglo y medio de teoría evolutiva en un solo párrafo podríamos decir:

La variación aleatoria en los genes produce variaciones fenotípicas en los individuos. Algunos individuos sobrevivirán mejor que otros en un entorno particular, y es probable que estos individuos tengan una descendencia más numerosa. Estos descendientes pueden heredar la misma variación genética ventajosa que tenían sus padres y tener, por lo tanto, el mismo éxito reproductivo que ellos. Eventualmente, muchas generaciones después, habrá surgido por evolución una especie distinta.

La materia prima de la variación aleatoria es una mutación en la secuencia del ADN del individuo, su genoma. Los índices de mutación son generalmente muy bajos, y por ello se necesita mucho tiempo para que una mutación ventajosa se desarrolle y se propague por la población. Este es especialmente el caso si la mutación solo da a un individuo una ligera ventaja sobre sus competidores en un entorno particular.

Aquí es donde el modelo lamarckiano de los caracteres adquiridos falla realmente, respecto a los modelos darwinianos. Un cambio adquirido en el fenotipo tendría de algún modo que afectar retroactivamente al guión del ADN reescribiéndolo espectacularmente, de modo que la característica adquirida pudiera transmitirse en el espacio de tan solo una generación, de padre a hijo. Pero hay pocas pruebas de que sea esto lo que sucede, excepto ocasionalmente y como respuesta a sustancias químicas o radiaciones que dañan el ADN (mutágenos), causando un cambio en la secuencia de pares de bases.

Incluso estos mutágenos afectan solamente al genoma en un porcentaje relativamente bajo de pares de bases y con un patrón aleatorio, y por ello no pueden dirigir la herencia de caracteres adquiridos de ningún modo significativo.

Hay una cantidad abrumadora de datos en contra de la tesis lamarckiana de la herencia, y por tanto pocos motivos para que los científicos opten por trabajar experimentalmente en ese marco, lo que no tiene nada de extraño. Al fin y al cabo, si usted es un científico interesado en el sistema solar, podría optar por investigar la hipótesis de que al menos algunas partes de la luna son de queso, pero para hacerlo tendría que ignorar deliberadamente la gran cantidad de pruebas existentes en contra de ella, lo cual sería un enfoque muy poco racional.

Existe también posiblemente una razón cultural que explica por qué los científicos rehúyen la investigación experimental de la herencia de los caracteres adquiridos. Uno de los casos más conocidos de fraude científico es el de Paul Kammerer, que trabajó en Austria durante la primera mitad del siglo XX. Kammerer afirmaba haber demostrado la herencia de los caracteres adquiridos en una especie conocida como el sapo partero.

Kammerer sostenía que cuando cambiaba las condiciones en que se criaban los sapos, estos desarrollaban adaptaciones "útiles". Estas adaptaciones eran unas estructuras de color negro en sus extremidades anteriores llamadas 'almohadillas nupciales'. Desgraciadamente, muy pocos de los especímenes estudiados fueron conservados o convenientemente almacenados, y cuando un científico rival examinó uno de estos especímenes descubrió que le habían inyectado tinta china en la almohadilla. Kammerer negó tener conocimiento de aquella contaminación y poco después se suicidó. Este escándalo mancilló la reputación de un campo ya de por sí polémico[1].

Una de las afirmaciones que hemos hecho en nuestro resumen de urgencia de la historia de la teoría evolucionista ha sido esta: "Un cambio adquirido en el fenotipo tendría de algún modo que afectar retroactivamente al guión del ADN reescribiéndolo espectacularmente, de modo que la característica adquirida pudiera transmitirse en el espacio de tan solo una generación, de padre a hijo."

Resulta ciertamente difícil imaginar cómo una influencia medioambiental sobre las células de un individuo podría actuar en un gen específico para cambiar la secuencia de pares de bases. Pero por otra parte es obvio que se producen efectivamente modificaciones epigenéticas en determinados genes –ya sea la metilación del ADN o alteraciones en las histonas– en respuesta a las influencias ambientales sobre una célula. La respuesta a las señales hormonales que hemos mencionado en un capítulo anterior era un ejemplo de esto.

Normalmente, una hormona como el estrógeno se ligará a un receptor en una célula, por ejemplo, del pecho. El estrógeno y el receptor permanecen juntos y entran en el núcleo de la célula. Se unen a unos motivos específicos del ADN –bases A, C, G y T en una secuencia particular– que se encuentran en los promotores de ciertos genes. Esto contribuye a la activación de los genes. Cuando se une a estos motivos, el estrógeno receptor también atrae a varias enzimas epigenéticas. Estas alteran las modificaciones de las histonas, eliminando marcadores que reprimen la expresión de los genes y poniendo marcadores que tienden a activar a otros genes. De esta forma, el entorno, actuando por medio de las hormonas, puede cambiar el patrón epigenético en unos genes específicos.

Estas modificaciones epigenéticas no cambian la secuencia de un gen, pero alteran la forma en que se expresa el gen. Esta es, al fin y al cabo, la base de la programación del desarrollo para enfermedades posteriores. Sabemos que las modificaciones epigenéticas pueden transmitirse de célula madre a célula hija, ya que esta es la razón de que no nos salgan dientes en los globos oculares. Si un mecanismo similar transmitiese una modificación epigenética ambientalmente inducida desde un individuo a su descendencia, tendríamos un mecanismo para explicar una especie de herencia lamarckiana. Un cambio epigenético (por oposición a un cambio genético) pasaría en este caso de padre a hijo.

La herejía y la Hambruna Invernal Holandesa

Está muy bien reflexionar en cómo podría suceder esto, pero lo que realmente necesitamos saber es si los caracteres adquiridos pueden realmente heredarse de este modo. No como sucede, sino una cuestión aún más básica: ¿sucede? Increíblemente, parece que hay unas situaciones concretas en que esto realmente sucede. Esto no significa que los modelos darwiniano/mendeliano sean erróneos, sino que, como siempre, el mundo de la biología es más complicado de lo que habíamos imaginado.

La literatura científica sobre este asunto contiene algunos términos confusos. Algunos trabajos tempranos se refieren a la transmisión epigenética de un rasgo adquirido, pero no parece existir ninguna prueba en ellos de cambios en la metilación del ADN o de alteraciones en las histonas. No es un problema de dejadez por parte de los autores de dichos trabajos. Se debe a las diferentes formas en que se ha utilizado la palabra “epigenética”. En estos trabajos tempranos la frase “transmisión epigenética” se refiere a la herencia que no puede

explicarse por la genética. En estos casos, la palabra “epigenética” se usa para describir el fenómeno, no el mecanismo molecular. Para tratar de ser algo más claros, nosotros utilizaremos la frase “herencia transgeneracional” para describir el fenómeno de la transmisión de un carácter adquirido y solo utilizamos “epigenética” para describir fenómenos moleculares.

Las pruebas más contundentes a favor de la herencia transgeneracional provienen de los supervivientes de la Hambruna Invernal Holandesa. Debido a que Holanda tiene una infraestructura médica excelente y unos niveles elevados de recogida y mantenimiento de historiales médicos, los epidemiólogos han podido seguir a los supervivientes del período de hambruna durante muchos años. De manera significativa, pudieron seguir no solo a personas que estaban vivas en el momento en que se produjo la hambruna, sino también a sus hijos y a sus nietos.

Este seguimiento identificó un efecto extraordinario. Como ya hemos visto, cuando las mujeres embarazadas sufrieron desnutrición durante los tres primeros meses del embarazo, sus hijos nacieron con un peso normal, pero de adultos tuvieron un riesgo mayor de lo normal de padecer obesidad y otros trastornos. Curiosamente, cuando las mujeres de este grupo de hijos fueron madres, su primer hijo tendió a pesar más que en los grupos de control[23]. Esto se muestra en la figura 6.1, donde los tamaños relativos de los niños se han exagerado para mayor claridad, y en la que hemos dado nombres holandeses arbitrarios a las mujeres.

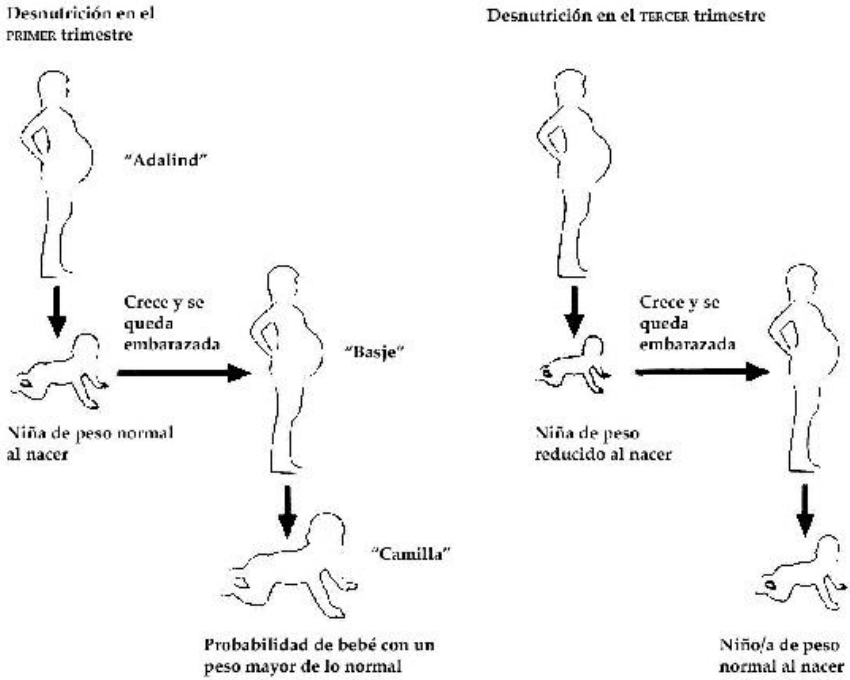

Figura 6.1: Los efectos de la desnutrición en dos generaciones de hijos y nietos de mujeres que estuvieron embarazadas durante la Hambruna Invernal Holandesa. El período de desnutrición durante el embarazo fue crítico en los efectos subsiguientes en el peso corporal de los bebés.

Los efectos sobre el peso al nacer de Camilla que se muestran en la parte inferior izquierda son realmente extraños. Cuando Camilla se estaba desarrollando, su madre Basje estaba presumiblemente sana. El único período de desnutrición que había sufrido Basje había sido veinte o más años atrás, cuando ella misma estaba en las primeras fases de su desarrollo en el útero. Y sin embargo, parece que esto tiene consecuencias para su propio bebé, aunque Camilla nunca haya estado expuesta a un período de desnutrición durante una fase temprana de su desarrollo.

Este parece un buen ejemplo de herencia transgeneracional (lamarckiana), pero ¿ha sido causada por un mecanismo epigenético? ¿Se transmitió un cambio epigenético (metilación alterada del ADN y/o variaciones en las modificaciones de las histonas) que tuvo lugar en Basje como resultado de la desnutrición durante las primeras doce semanas de desarrollo en el útero, a través del núcleo de su óvulo, a su propia hija? Tal vez, pero no debemos ignorar que hay otras explicaciones potenciales.

Por ejemplo, podría haberse producido un efecto no identificado de la desnutrición temprana, consistente en que, cuando estaba embarazada, Basje hubiese pasado a su feto a través de la placenta

más nutrientes de lo normal. Esto podría también crear un efecto transgeneracional –un mayor tamaño de Camilla–, pero no habría sido causado porque Basje hubiese pasado una modificación epigenética a Camilla. Habría sido causado por las condiciones existentes en el útero cuando Camilla se estaba desarrollando y creciendo (el entorno intrauterino).

También es importante recordar que un óvulo humano es grande. Contiene un núcleo que es relativamente pequeño comparado con el citoplasma circundante. Imaginemos un grano de uva dentro de una mandarina para hacernos una idea aproximada de los tamaños respectivos. El citoplasma desempeña una serie de funciones cuando un óvulo es fertilizado. Tal vez ocurrió algo durante la programación de la primera fase del desarrollo en Basje que hizo que en última instancia el citoplasma de su óvulo contuviese algo fuera de lo común. Esto puede parecer improbable pero la producción de óvulos en las hembras de los mamíferos se inicia realmente muy pronto durante su propio desarrollo embrionario. Las primeras fases del desarrollo del zigoto dependen en gran medida del citoplasma del óvulo. Una anormalidad en el citoplasma podría estimular una pauta de crecimiento anormal en el feto. También esto tendría como consecuencia una herencia transgeneracional, pero no mediante la transmisión directa de una modificación epigenética.

Vemos, por tanto, que hay varios mecanismos que podrían explicar los patrones hereditarios observados en la línea materna de los supervivientes de la Hambruna Invernal Holandesa. Si pudiésemos estudiar una situación humana menos complicada nos ayudaría a entender si la epigenética desempeña un papel en la herencia adquirida. Idealmente tendría que ser una situación en la que no tuviésemos que preocuparnos de los efectos del entorno intrauterino o del citoplasma del óvulo.

Veamos lo que pasa en el caso de los padres. Dado que los hombres no se quedan embarazados, no pueden contribuir al entorno del desarrollo del feto. Los varones tampoco hacen una contribución muy importante al citoplasma del zigoto. Los espermatozoides son muy pequeños y son casi todo núcleo –son como pequeñas balas con cola. O sea que si observamos herencia transgeneracional de padre a hijo no es probable que haya sido causada por efectos intrauterinos o citoplasmáticos. En estas circunstancias, un mecanismo epigenético sería un atractivo candidato para explicar la herencia transgeneracional de un carácter adquirido.

Colegas glotones en Suecia

Algunos de los datos que sugieren que puede darse la herencia transgeneracional en los humanos proceden de otro estudio histórico. En el norte de Suecia hay una región geográficamente aislada llamada Överkalix. A finales del siglo XIX y comienzos del XX hubo unos períodos de una terrible escasez de alimentos (causados por malas cosechas, acciones militares y deficiencias en el transporte), intercalados con períodos de gran abundancia. Los científicos han estudiado las pautas de mortalidad de los descendientes de las personas que estaban vivas durante estos períodos. En particular analizaron la ingesta de alimentos durante una fase de la infancia conocida como SGP [slow growth period o período de crecimiento lento]. Siendo todos los demás factores iguales, los niños crecen más lentamente durante los años anteriores a la pubertad. Este es un fenómeno completamente normal observado en todas las poblaciones.

Utilizando registros históricos los investigadores dedujeron que si el alimento había escaseado durante un período SGP del padre, el hijo tenía un riesgo menor de morir de una enfermedad cardiovascular (como infarto, embolia, hipertensión u obstrucción de las arterias coronarias). Si, por otro lado, un hombre había tenido acceso a un exceso de comida durante el SGP, sus nietos tenían un riesgo mayor de morir a consecuencia de enfermedades diabéticas[4]. Igual que la Camilla de la Hambruna Invernal Holandesa, los hijos y nietos tenían un fenotipo alterado (un cambio en el riesgo de muerte a causa de una enfermedad cardiovascular o de la diabetes) en respuesta a una circunstancia medioambiental que ellos mismos nunca habían experimentado.

Estos datos no pueden ser el resultado del entorno intrauterino ni de un efecto citoplasmático, por los motivos anteriormente subrayados. Por lo tanto, parece razonable avanzar la hipótesis de que las consecuencias transgeneracionales de la disponibilidad de alimento en la generación de los abuelos se transmitían epigenéticamente. Estos datos son particularmente sorprendentes si consideramos que el efecto nutricional original ocurrió cuando los muchachos eran pre-pubescentes y por tanto aún no habían empezado a producir espermatozoides. Aun así habían podido transmitir un efecto a sus hijos y nietos.

Sin embargo, hay que hacer algunas advertencias acerca de este trabajo sobre la herencia transgeneracional por medio de la línea masculina. En particular es arriesgado fiarse de los registros de mortalidad antiguos y extrapolar hacia atrás utilizando datos históricos. Además, algunos de los efectos observados no eran muy pronunciados. Este es un problema frecuente cuando se trabaja con poblaciones humanas, junto con los demás aspectos que ya hemos discutido, como nuestra variabilidad genética y la imposibilidad de

controlar el entorno de un modo importante. Siempre existe el riesgo de sacar conclusiones inapropiadas de nuestros datos, tal como pensamos que hizo Lamarck en su estudio de las familias de herreros.

El ratón hereje

¿Hay una forma alternativa de investigar la herencia transgeneracional? Si este fenómeno también se diese en otras especies estaríamos mucho más seguros de que estos efectos son reales. Esto es así porque es posible diseñar experimentos con sistemas-modelo para poner a prueba hipótesis concretas, en vez de utilizar solamente los datos que nos proporciona la naturaleza (o la historia).

Y aquí es donde hemos de volver al ratón agutí. El trabajo de Emma Whitelaw demostró que el color variable del pelaje del ratón agutí se debía a un mecanismo epigenético, concretamente a la metilación del ADN de un retrotransposón en el gen agutí. Ratones con el pelaje de diferente color tenían la misma secuencia de ADN, pero un grado diferente de modificación epigenética en el retrotransposón.

La profesora Whitelaw decidió investigar si el color del pelaje era heredable. Si lo era, quedaría demostrado que no es solo el ADN lo que se transmite de padres a hijos, sino también las modificaciones epigenéticas del genoma. Esto proporcionaría un mecanismo potencial para la herencia transgeneracional de caracteres adquiridos.

Cuando Emma Whitelaw permitió reproducirse a unas ratonas agutí, encontró el efecto que se muestra en la figura 6.2. Para facilitar la exposición, el dibujo solo muestra a los ratones que heredaron el retrotransposón A^{vy} de su madre, pues este es el efecto que nos interesa.

Si la madre tenía un gen A^{vy} no metilado, y por tanto tenía el pelaje amarillo, todas sus crías tenían también un pelaje amarillo, o ligeramente moteado. Nunca producía crías que desarrollasen el pelaje muy oscuro asociado con la metilación del retrotransposón.

Si, al contrario, el gen A^{vy} de la madre estaba fuertemente metilado, lo que hacía que su pelaje fuese muy oscuro, algunas de sus crías también tenían el pelaje oscuro. Si tanto la abuela como la madre tenían el pelaje oscuro, el efecto era todavía más pronunciado. Aproximadamente una tercera parte de las crías tenían el pelaje oscuro, comparado con una de cada cinco que se muestra en la figura 6.2.

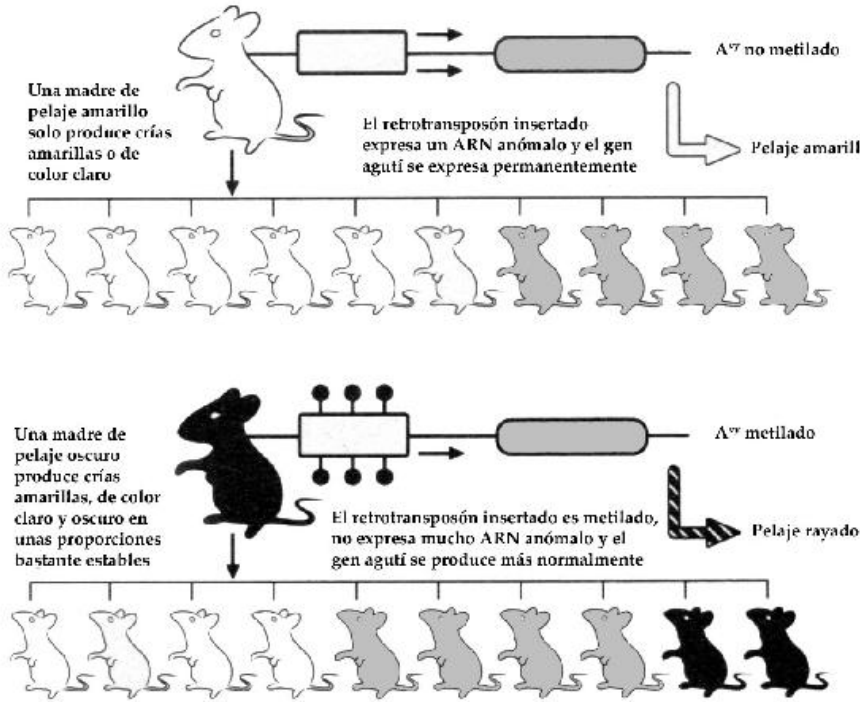

Figura 6.2: El color del pelaje de ratonas genéticamente idénticas influye en el color del pelaje de sus crías. Las ratonas de pelaje amarillo, en las que el gen agutí se expresa continuamente debido a los bajos niveles de metilación del ADN del retrotransposón regulador, nunca producen crías oscuras. Las características epigenéticamente –más que genéticamente– determinadas de la madre influyen en sus crías.

Debido a que Emma Whitelaw estaba trabajando con ratones endogámicos, pudo llevar a cabo este experimento muchas veces y generar cientos de ratones genéticamente idénticos. Esto era importante, porque cuantos más datos tenemos de un experimento, más fiables son los resultados. Pruebas estadísticas pusieron de manifiesto que las diferencias fenotípicas entre grupos genéticamente idénticos eran muy significativas. Dicho de otro modo, era muy improbable que los efectos se hubiesen producido por casualidad[5].

Los resultados de estos experimentos mostraron que un efecto genéticamente mediado (el patrón del color del pelaje en función de la metilación del ADN) en un animal se transmitía a sus crías. Pero ¿heredaban realmente los ratones directamente una modificación epigenética de su madre?

Existía la posibilidad de que los efectos observados no fuesen directamente causados por herencia de una modificación epigenética en el retrotransposón A_{vy}, sino por medio de algún otro mecanismo. Cuando el gen agutí se activa demasiado, no solo causa que el pelaje del ratón sea amarillo. El gen *agutí* también regula mal la expresión de

otros genes, lo que eventualmente hace que los ratones amarillos sean también gordos y diabéticos. Por lo tanto es probable que el entorno intrauterino fuese diferente en las hembras embarazadas de pelaje amarillo y oscuro, con una diferente disponibilidad de nutrientes para sus embriones. La disponibilidad de nutrientes podía por sí misma cambiar la forma en que unas marcas epigenéticas determinadas se depositaban en el retrotransposón A^{vy} de las crías. Esto parecería herencia epigenética, pero en realidad las crías no habrían heredado directamente el patrón de metilación del ADN de su madre, sino que simplemente habrían pasado por un proceso similar de programación del desarrollo en respuesta a la disponibilidad de nutrientes en el útero.

De hecho, cuando Emma Whitelaw realizaba sus experimentos, los científicos ya sabían que la dieta puede influir en el color del pelaje de ratones *agutí*. Cuando las ratonas *agutí* embarazadas reciben una dieta rica en las sustancias químicas que pueden suministrar grupos metilo a las células (donantes de metilo), las proporciones entre los diferentes colores del pelaje de las crías cambian[6]. Esto se debe presumiblemente a que las células pueden utilizar más grupos metilo y depositar más metilación en su ADN, anulando de este modo la expresión anómala del gen *agutí*. Esto significaba que el equipo de Whitelaw tenía que ser realmente meticuloso controlando el efecto de la nutrición intrauterina en sus experimentos.

En uno de esos experimentos que simplemente no es posible hacer con humanos, transfirieron óvulos fertilizados obtenidos de madres de pelaje amarillo y los implantaron en hembras de pelaje oscuro y viceversa. En cada caso, la distribución de patrones de color de pelaje en las crías era la misma que cabía esperar del donante de óvulo, es decir, de la madre biológica, y no de la madre de alquiler. Esto puso de manifiesto de manera inequívoca que no era el entorno intrauterino el que controlaba el patrón de colores del pelaje. Utilizando unos complejos planes de reproducción, también demostraron que la herencia del patrón de color del pelaje no se debía al citoplasma del óvulo. Tomados en conjunto, la interpretación más sencilla de estos datos es que la herencia epigenética ha tenido lugar. Dicho de otro modo, una modificación epigenética (probablemente la metilación del ADN) fue transferida junto con el código genético.

Esta transferencia del fenotipo de una generación a la siguiente no era perfecta –no todas las crías tenían exactamente el mismo aspecto que su madre. Esto implica que la metilación del ADN que controla la expresión del fenotipo agutí no era enteramente estable a lo largo de las generaciones. Esto es bastante parecido a los efectos que observamos en los supuestos casos de herencia transgeneracional humana, como la Hambruna Invernal Holandesa. Si observamos a un

grupo lo suficientemente grande de personas en nuestro estudio podemos detectar diferencias en el peso al nacer entre varios grupos, pero no podemos hacer predicciones absolutas respecto a un solo individuo.

Se da también un fenómeno específico de género y poco común en la variedad *agutí*. Aunque la pauta de color del pelaje mostraba un claro efecto transgeneracional al pasar de madre a hijo, no se observaba este efecto cuando un macho pasaba el retrotransposón Avy a su descendencia. Era indiferente que un ratón tuviera el pelaje amarillo, ligeramente rayado u oscuro. Cuando engendraba una camada, era muy probable que se diesen en ella los diferentes patrones de color del pelaje.

Hay, sin embargo, otros ejemplos de herencia epigenética transmitida tanto por machos como por hembras. El fenotipo de la cola enroscada en los ratones, causado por una metilación variable de un retrotransposón en el gen *Axin*^{Fu}, puede transmitirse tanto por la madre como por el padre[7]. Esto hace improbable que la herencia transgeneracional de este rasgo se deba a influencias intrauterinas o citoplásmicas, porque los progenitores machos contribuyen muy poco a estas. Es mucho más probable que se dé la transmisión de una modificación epigenética en el gen *Axin*^{Fu} de cualquier progenitor a las crías.

Estos sistemas modelo han sido realmente útiles para demostrar que se produce la herencia transgeneracional de un fenotipo no genético, y que tiene lugar por medio de modificaciones epigenéticas. Esto es verdaderamente revolucionario. Confirma que en algunas situaciones muy concretas tiene lugar la herencia lamarckiana, y que estamos entendiendo el mecanismo molecular subyacente a ella. Pero tanto el fenotipo agutí como el de la cola enroscada de los ratones dependen de la presencia de unos retrotransposones específicos en el genoma. ¿Son casos especiales o hay en juego un efecto más general? Una vez más, nos fijamos en algo que tiene algo más de relevancia para nosotros: la comida.

La epigenética de la obesidad

Como sabemos todos, está en curso una verdadera epidemia de la obesidad. Se está extendiendo por todo el mundo, aunque avanza a un ritmo más acelerado en las sociedades más industrializadas. El gráfico francamente aterrador de la figura 6.3 presenta las cifras correspondientes al Reino Unido del año 2007[8], y pone de manifiesto que aproximadamente dos de cada tres adultos tiene sobrepeso (un

índice de masa corporal de 25 o superior) o es obeso (un índice de masa corporal superior a 30). La situación es todavía peor en EEUU. La obesidad está asociada a una amplia serie de problemas de salud, incluidos los trastornos cardiovasculares y la diabetes de tipo 2. Las personas obesas de más de 40 años morirán, por término medio, 6 o 7 años antes que las no obesas[9].

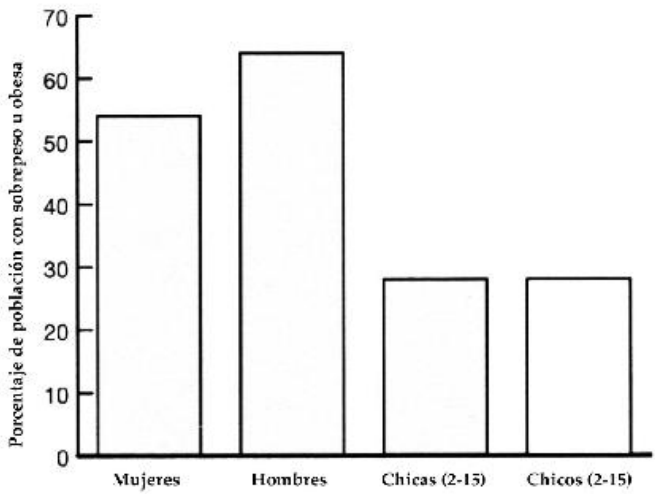

Figura 6.3: Porcentaje de la población del Reino Unido que tenía sobrepeso u obesidad en 2007.

Los datos de la Hambruna Invernal Holandesa y otras hambrunas apoyan la idea de que una mala nutrición durante el embarazo tiene efectos en la descendencia, y que estas consecuencias pueden transmitirse también a generaciones posteriores. Dicho de otro modo, una mala nutrición puede tener efectos epigenéticos en generaciones posteriores. Los datos de la cohorte Överkalix, aunque más difíciles de interpretar, sugerían que un exceso de consumo en momentos clave de la vida de un muchacho pueden tener consecuencias adversas en generaciones posteriores. ¿Es posible que la epidemia de obesidad en la población humana tenga repercusiones en los hijos y los nietos de las personas obesas? Como no parece razonable esperar 40 años para averiguarlo, los científicos están de nuevo utilizando modelos animales para tratar de obtener unos conocimientos útiles.

Los primeros datos animales sugerían que la nutrición podría no tener grandes repercusiones transgeneracionalmente. El cambio en el patrón de color del pelaje cuando a las ratonas agutí embarazadas se les administró una dieta alta en donantes de metilo no se transmitió a la siguiente generación[10]. Pero este tal vez sea un modelo demasiado especializado. El año 2010 se publicaron dos trabajos que deberían al menos hacernos reflexionar. Se publicaron en dos de las mejores revistas científicas del mundo –Nature y Cell. En ambos casos, los investigadores sobrealimentaron a animales machos y luego estudiaron los efectos que ello tenía en su descendencia. Restringiendo sus experimentos a los machos, no tenían que preocuparse de las complicaciones intrauterinas y citoplásmicas que provocan tantos (metafóricos) dolores de cabeza cuando el objeto de estudio son las hembras.

Uno de los estudios utilizaba una raza de ratones llamada Sprague-Dawley. Es un ratón albino de temperamento muy tranquilo que lo hace fácil de mantener y manejar. En los experimentos se administró a machos Sprague-Dawley una dieta alta en grasas, y se les permitió aparearse con hembras alimentadas con una dieta ordinaria. Los machos sobrealimentados tenían sobrepeso (lo que no tiene nada de sorprendente), un porcentaje muy alto de grasas respecto a masa muscular, y muchos de los síntomas que se encuentran en la diabetes de tipo 2 en los humanos. Sus crías tenían un peso normal pero también muchas de las anomalías propias de la diabetes[11]. Muchos de los genes que controlan el metabolismo y el consumo de energía en los mamíferos estaban mal regulados en estas crías. Por motivos no muy bien comprendidos, eran particularmente las crías hembras las que presentaban este efecto.

Un grupo totalmente independiente estudió los efectos de la dieta en una variedad de ratones endogámicos. A los ratones machos se les administró una dieta anormalmente baja en proteínas. Para

compensarlo, la dieta contenía un porcentaje de azúcar mayor de lo normal. Los machos fueron apareados con hembras alimentadas con una dieta normal. Los investigadores examinaron la expresión de genes en el hígado (el principal órgano del cuerpo por lo que respecta al metabolismo) en crías de tres semanas de estos apareamientos. Analizando un gran número de crías encontraron que la regulación de muchos de los genes implicados en el metabolismo era anómala en las crías de los machos a los que se había administrado la dieta modificada[12]. También encontraron cambios en las modificaciones epigenéticas en los hígados de estas crías.

Así, ambos estudios ponen de manifiesto que, por lo menos en el caso de los roedores, la dieta de un padre puede influir directamente en las modificaciones epigenéticas, en la expresión de los genes y en la salud de sus crías. Y no a causa del entorno –esto no tiene nada que ver con el hecho del padre que solo da de comer a sus hijos hamburguesas y patatas fritas. Es un efecto directo y se dio con tanta frecuencia en ratas y ratones que no puede deberse a mutaciones inducidas por la dieta, porque estas no se dan a este ritmo. Así que la explicación más probable es que la dieta induce efectos epigenéticos que pueden transmitirse de padre a hijo. Aunque los datos son solo preliminares, los resultados del estudio de los ratones los respaldan.

Si analizamos los datos en su totalidad –desde los humanos a los roedores, desde las hambrunas a los banquetes– emerge un patrón bastante preocupante. Es posible que el viejo dicho según el cual somos lo que comemos no vaya suficientemente lejos y tal vez habría que decir que somos también lo que comieron nuestros padres y nuestros abuelos.

Esto debería hacernos reflexionar sobre si tiene sentido o no seguir los consejos sobre una vida sana. Si todos somos víctimas del determinismo epigenético, significa que nuestra suerte ya está echada y que simplemente estamos a merced de los patrones de metilación de nuestros antepasados. Pero este es un modelo demasiado simplista. Hay una cantidad abrumadora de datos a favor de que los consejos dados por las agencias gubernamentales y por muchas organizaciones benéficas –seguir una dieta sana rica en frutas y verduras, no pasarse el día tumbado en el sofá, no fumar– son perfectamente razonables. Somos organismos complejos y nuestra salud y esperanza de vida están influidas por nuestro genoma, nuestro epigenoma y nuestro entorno. Pero recordemos que ni siquiera en el caso de los ratones agutí endogámicos, mantenidos en unas condiciones estandarizadas, pudieron los investigadores predecir exactamente lo amarillo que sería el pelaje o lo gordo que estaría un ratón recién nacido en concreto de la camada. ¿Por qué no hacer todo lo que esté en nuestra mano para mejorar nuestras probabilidades de tener una vida sana y larga? Y si

tenemos intención de tener hijos, ¿acaso no desearíamos hacer lo posible para darles ese empujoncito que los acerque un poco más a una buena salud?

Siempre habrá cosas que estarán fuera de nuestro control, por supuesto. Uno de los ejemplos mejor documentados de un factor medioambiental que tiene consecuencias epigenéticas y que dura al menos cuatro generaciones, es una toxina ambiental. La vinclozolina es un fungicida que suele usarse con bastante frecuencia en la industria vinatera. Si entra en el cuerpo de un mamífero se convierte en un compuesto que se une al receptor de andrógenos. Este es el receptor que liga a la testosterona, una hormona masculina que es vital para el desarrollo sexual y la producción de esperma, y que tiene otros muchos efectos en los machos. Cuando la vinclozolina se une al receptor de andrógenos, impide que la testosterona transmita sus señales habituales a las células, bloqueando de este modo los efectos normales de la hormona.

Si se administra vinclozolina a ratonas embarazadas en el momento en que se desarrollan los testículos en los embriones, las crías machos nacen con defectos testiculares y ven reducida su fertilidad. Ese mismo efecto se da en las tres generaciones siguientes[13]. Aproximadamente un 90 por ciento de los ratones machos se ven afectados, un porcentaje demasiado alto para pensar que lo haya causado una mutación clásica del ADN. Incluso los índices de mutación más elevados, en regiones particularmente sensibles del genoma, son al menos diez veces menos frecuentes que esto. En estos experimentos con ratones solamente una generación fue expuesta a la vinclozolina, pero el efecto duró al menos cuatro generaciones, de modo que este es otro ejemplo de herencia lamarckiana. Dado el patrón de transmisión de los machos es probable que este sea otro ejemplo de un mecanismo epigenético de la herencia. Otro trabajo adicional de este mismo grupo de investigación ha identificado regiones del genoma en las que el tratamiento con vinclozolina lleva a unas extrañas pautas de metilación del ADN[14].

Los ratones de los estudios descritos más arriba fueron tratados con dosis elevadas de vinclozolina, unas dosis mucho más elevadas de las que se cree que pueden encontrar los humanos en el medio ambiente. De todos modos, efectos como estos han motivado que las autoridades hayan empezado a investigar si las hormonas artificiales y la emisión de sustancias que pueden afectar a las hormonas (desde la excreción de sustancias químicas presentes en la píldora anticonceptiva hasta determinados pesticidas) tienen el potencial de producir sutiles efectos transgene- racionales en la población humana.

1. Si el lector está interesado en conocer más detalles al respecto, puede leer el excelente aunque partidista libro de Arthur Koestler, The

Case of the Midwife Toad [El caso del sapo partero].
2. Lumey et al. (1995), Eur J Obstet Reprod Biol. 61: 23-20.
3. Lumey (1998), Proceedings of the Nutrition Society 57: 129-135.
4. Kaati et al. (2002), EJHG 10: 682-688.
5. Morgan et al. (1999), Nature 23: 314-8.
6. Wolff et al. (1998), FASEB J 12: 949-957.
7. Rakyan et al. (2003), PNAS 100: 2.538-2.543.
8. Cifras del World Cancer Research Fund: http://tinyurl.com/47uosv4
9. www.nhs.uk
10. Waterland et al. (2007), FASEB J 21: 3.380-3.385.
11. Ng et al. (2010), Nature 467: 963-966.
12. Carone et al. (2010), Cell 143: 1.084-1.096.
13. Anway et al. (2005), Science 308: 1.466-1.469.
14. Guerrero-Bosagna et al. (2010), PLoS One: 5.

Capítulo 7
El juego de las generaciones

Los animales entraron de dos en dos. ¡Hurrah! ¡Hurrah!
Canción tradicional

A veces, la mejor ciencia comienza con la más sencilla de las preguntas. Puede parecer una pregunta tan obvia que casi nadie piense en formularla y mucho menos en contestarla. No cuestionamos aquello que nos parece completamente evidente. Pero de vez en cuando, cuando alguien se levanta y pregunta: "¿Como es que pasa esto?", todos nos damos cuenta de que un fenómeno que parecía demasiado obvio para mencionarlo constituye en realidad un completo misterio. Esto vale también para uno de los aspectos más fundamentales de la biología humana, uno en el que casi nunca pensamos.

Cuando dos mamíferos (incluidos los humanos) se reproducen, ¿por qué requiere esto un progenitor macho y uno hembra?

En la reproducción sexual, el espermatozoide, pequeño y muy energético nada como loco para llegar al óvulo, grande y sedentario. Cuando un espermatozoide ganador penetra en el óvulo, los núcleos de las dos células se fusionan para crear el zigoto, que luego se divide para formar todas las células del cuerpo. Espermatozoides y óvulos se conocen como gametos. Cuando se producen los gametos en el cuerpo de los mamíferos, cada gameto recibe solamente la mitad del número total de cromosomas. Esto significa que solo tienen 23 cromosomas, uno de cada par. Esto se conoce como el genoma haploide. Cuando los dos núcleos se fusionan una vez que el espermatozoide ha penetrado en el óvulo, el número de cromosomas vuelve a ser el de las células ordinarias (46) y el genoma se llama diploide. Es importante que tanto el espermatozoide como el óvulo sean haploides, de lo contrario cada generación acabaría teniendo el doble de cromosomas que la generación anterior.

Podemos formular la hipótesis según la cual la razón de que todos los mamíferos tengamos un padre y una madre es que esto es lo que se necesita para que dos genomas haploides se conozcan el uno al otro y creen una nueva célula con una dotación completa de cromosomas. Esto es ciertamente lo que sucede normalmente, pero este modelo también implicaría que el único motivo, biológicamente hablando, de que tengamos un padre de cada sexo es una especie de sistema de reparto.

El nieto de Conrad Waddington

El año 2010 el profesor Robert Edwards recibió el Premio Nobel de Fisiología o Medicina por su trabajo pionero en el campo de la fertilización in vitro, que llevó a los denominados niños-probeta. En ese trabajo se extraían óvulos del cuerpo de una mujer, se fertilizaban en el laboratorio y se reimplantaban de nuevo en el útero. La fertilización in vitro era un desafío enorme, y el éxito del profesor Edwards en la reproducción humana se basó en años de minucioso trabajo con ratones.

Este trabajo con los ratones sentó las bases de una notable serie de experimentos que demostraron que el sistema de reproducción de los mamíferos es mucho más que un sistema de reparto. La principal fuerza en este campo es el profesor Azim Surani, de la Universidad de Cambridge, que empezó su carrera científica obteniendo su doctorado bajo la dirección de Robert Edwards. Dado que el profesor Edwards se formó en el laboratorio de Conrad Waddington, podemos pensar en Azim Surani como en el nieto intelectual de Conrad Waddington.

Azim Surami es otro de estos académicos norteamericanos que lleva su prestigio con mucha normalidad, pese a su estatus. Es miembro de la Royal Society y comandante del Imperio Británico, y ha sido galardonado con la prestigiosa Medalla Gabor y con la medalla de la Royal Society. Igual que John Gurdon y Adrian Bird, continúa abriendo nuevos caminos en un área de investigación que él mismo contribuyó a iniciar hace un cuarto de siglo.

A mediados de los años 1980 Azim Surami llevó a cabo un programa de experimentos que mostró inequívocamente que la reproducción en los mamíferos es algo mucho más complejo que un sistema de reparto. No solo necesitamos una madre biológica y un padre biológico porque así es como dos genomas haploides se fusionan para formar un núcleo diploide. De hecho, es enormemente importante que una mitad de nuestro ADN venga de nuestra madre y la otra mitad de nuestro padre.

La figura 7.1 muestra el aspecto que tiene un óvulo recién fertilizado, antes de que los dos genomas se encuentren. Es una figura exageradamente simplificada, pero servirá para nuestro propósito. Los núcleos haploides del óvulo y del espermatozoide se conocen como pronúcleos.

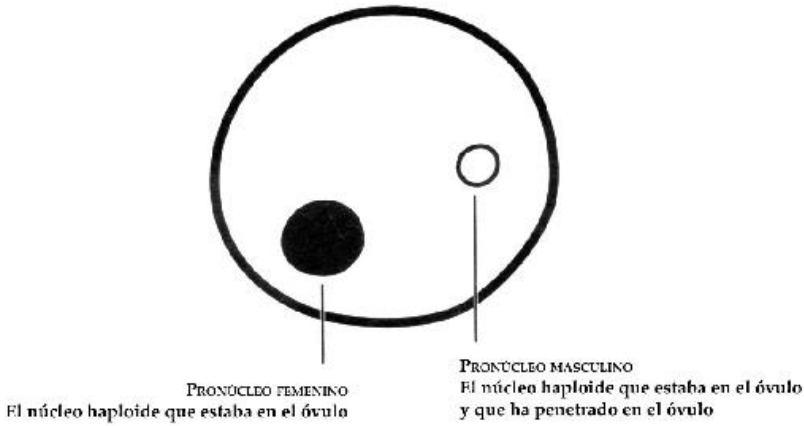

Figura 7.1: El óvulo de un mamífero justo después de haber sido penetrado por un espermatozoide, pero antes de que los dos pronúcleos haploides (con la mitad del número de cromosomas normal) se hayan fusionado. Nótese la diferencia de tamaño entre el pronúcleo procedente del óvulo y el procedente del espermatozoide.

Podemos ver que el pronúcleo femenino es mucho más grande que el masculino. Esto es muy importante experimentalmente, pues significa que podemos distinguir uno de otro los dos pronúcleos. Debido a que es posible distinguirlos, los científicos pueden transferir un pronúcleo de una célula a otra y estar seguros de cuál es el que han transferido. Saben si es un pronúcleo procedente del esperma del padre (pronúcleo masculino) o del óvulo de la madre (pronúcleo femenino).

Hace muchos años el profesor Gurdon utilizó unas diminutas micropipetas para transferir núcleos de células corporales de sapos a óvulos de sapo. Azim Surami utilizó un refinamiento de esta tecnología para transferir pronúcleos entre diferentes óvulos de ratón fertilizados. Los óvulos fertilizados manipulados fueron luego implantados en ratonas y se dejó que se desarrollase.

En una serie de trabajos publicados principalmente entre 1984 y 1987, el profesor Surani demostró que es esencial tener un pronúcleo masculino y uno femenino para poder producir nuevos ratones vivos. Esto se muestra gráficamente en la figura 7.2.

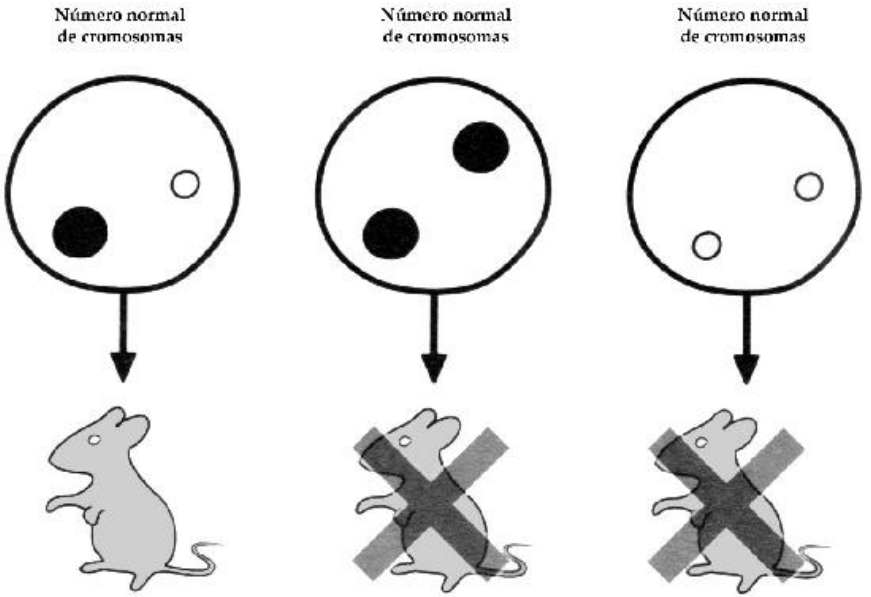

Figura 7.2: Resumen de los resultados del trabajo pionero de Azim Surani. Se extrajo el pronúcleo de un óvulo de ratón. Este óvulo donante fue luego inyectado con dos pronúcleos haploides y el óvulo diploide resultante se implantó en una madre ratona 'de alquiler'. Solo produjeron ratones vivos los óvulos que habían sido reconstituidos con un pronúcleo masculino y un pronúcleo femenino. Los embriones procedentes de óvulos reconstituidos con dos pronúcleos masculinos o dos pronúcleos femeninos no pudieron desarrollarse normalmente, y el embrión murió durante el proceso.

Para controlar los efectos de diferentes genomas de ADN, los investigadores utilizaron cepas endogámicas de ratones. De este modo se aseguraron de que los tres tipos de óvulo fertilizado que se muestran en el diagrama fueran genéticamente idénticos. Pero a pesar de ser genéticamente idénticos, una serie de experimentos realizados por Azim Surani y sus colegas[1,2,3], junto con otros trabajos realizados en los laboratorios de Davor Solter[4] y Bruce Cattanach[5], fueron concluyentes. Si el óvulo fertilizado contenía solamente dos pronúcleos femeninos, o dos pronúcleos masculinos, no producían ningún ratón vivo. Se precisaba un pronúcleo de cada sexo.

Este es un hallazgo absolutamente notable. En los tres escenarios que se muestran en el diagrama, el zigoto termina exactamente con la misma cantidad de material genético. Cada zigoto tiene un genoma diploide (dos copias de cada cromosoma). Si el único factor importante en la creación de un nuevo individuo era la cantidad de ADN, entonces los tres tipos de óvulo fertilizado tendrían que haberse desarrollado para formar nuevos individuos.

La cantidad no lo es todo

Esto llevó a un concepto revolucionario –los genomas materno y paterno pueden entregar el mismo ADN pero no son funcionalmente equivalentes. No basta con tener la cantidad correcta de la secuencia correcta de ADN. Hemos de heredar parte de nuestro padre y parte de nuestra madre. Nuestros "genes" recuerdan de algún modo de donde proceden. Solo funcionan adecuadamente si proceden del padre "correcto". Solo con tener el número correcto de copias de cada gen no se cumplen los requisitos para tener un desarrollo normal y para llevar una vida sana.

Sabemos que este no es un extraño efecto solo aplicable a los ratones, debido a que existe un trastorno humano que se da de un modo natural. En uno de cada 1.500 embarazos humanos, por ejemplo, hay una placenta en el útero pero no hay feto. La placenta es anómala y está cubierta de quistes como uvas llenos de fluido. Esta estructura se conoce como "mola hidaitidiforme", y en algunas poblaciones asiáticas la frecuencia de estos embarazos molares puede ser tan elevada como 1 de cada 200. Las mujeres aparentemente embarazadas ganan peso, a menudo más rápidamente que en un embarazo normal y también sufren náuseas matinales, a menudo en grado extremo. El rápido crecimiento de las estructuras placentarias produce unos niveles anormalmente elevados de una hormona que se cree es la responsable de los síntomas de mareo durante el embarazo.

En los países con una buena infraestructura sanitaria, la mola hidaitidiforme es normalmente detectada en una primera ecografía y a continuación un equipo médico procede a una interrupción del falso embarazo. Si no es detectada, la mola aborta normalmente de modo espontáneo a los cuatro o cinco meses de la fertilización. Cada detección de estas molas es importante por cuanto pueden formar tumores potencialmente peligrosos si no son extirpadas.

Estas molas se forman cuando un óvulo que por una u otra causa ha perdido su núcleo es fertilizado. En aproximadamente el 80 por ciento de los casos de embarazos molares hidaitidiformes, un óvulo vacío es fertilizado por un solo espermatozoide, y el genoma haploide de este es copiado para crear un genoma diploide. En aproximadamente el 20 por ciento de los casos el óvulo vacío es fertilizado simultáneamente por dos espermatozoides. En ambos casos el óvulo fertilizado tiene el número correcto de cromosomas (46), pero todo el ADN procede del padre. Debido a ello no se desarrolla ningún feto. Igual que en los ratones experimentales, el desarrollo humano requiere cromosomas de un padre y de una madre.

Este trastorno humano y los experimentos con ratones son imposibles de reconciliar con un modelo basado en el código del ADN,

donde el ADN es una molécula pura que solo contiene información en su secuencia de bases de pares A, C, G y T. El ADN solo no contiene toda la información necesaria para la creación de nueva vida. Se requiere algo más además de la información genética. Se requiere algo epigenético.

Óvulos y espermatozoides son células altamente especializadas –se encuentran al fondo de uno de los valles de Waddington. El óvulo y el espermatozoide nunca serán nada más que un óvulo y un espermatozoide. A menos que se fusionen. Una vez que se fusionan, estas dos células altamente especializadas forman una célula que está tan poco especializada que es totipotente y da origen a todas las células del cuerpo humano, y entre ellas a la placenta. Esta célula es el zigoto, que se encuentra en lo más alto del paisaje epigenético de Waddington. A medida que este zigoto se divide, las células se van volviendo cada vez más especializadas, formando todos los tejidos del cuerpo. Algunos de estos tejidos finalmente producen óvulos y espermatozoides (en función de nuestro sexo, naturalmente) y todo está preparado para que el ciclo se reanude. Se trata efectivamente de un círculo interminable en la biología del desarrollo.

Los cromosomas en los pronúcleos de espermatozoides y óvulos contienen un gran número de modificaciones epigenéticas. Esto es parte de lo que hace que estos gametos se comporten como gametos y que no se conviertan en otro tipo de células. Pero estos gametos no pueden transmitir sus patrones epigenéticos, porque si lo hiciesen el zigoto fertilizado sería una especie de semi-óvulo, semi-espermatozoide híbrido, cosa que claramente no es. Es una célula totipotente completamente diferente que dará lugar a un individuo enteramente nuevo. De algún modo, las modificaciones en óvulos y espermatozoides cambian a un conjunto diferente de modificaciones para llevar al óvulo fertilizado a un estado celular diferente, en una posición diferente en el paisaje epigenético de Waddington. Esto es parte del desarrollo normal.

Reinstalar el sistema operativo

Casi inmediatamente después de que el espermatozoide haya penetrado en el óvulo le sucede algo muy espectacular. Casi toda la metilación en el ADN del pronúclero masculino (es decir, el procedente del espermatozoide) desaparece de un modo increíblemente rápido. Lo mismo le pasa al ADN del pronúcleo femenino, aunque mucho más lentamente. Esto significa que buena parte de la memoria epigenética es borrada del genoma. Esto es vital

para poner al zigoto en lo alto del paisaje epigenético de Waddington. El zigoto empieza a dividirse y pronto crea el blastocisto –la pelota de golf dentro de la pelota de tenis de la que hablamos en el capítulo 2. Las células de la pelota de golf –la masa celular interior o ICM– son las células pluripotentes, las que dan lugar a las células madre embrionarias en el laboratorio.

Las células de la ICM pronto empiezan a diferenciarse y a dar lugar a las diferentes células de nuestros cuerpos. Esto sucede mediante la expresión estrechamente regulada de unos cuantos genes clave. Una proteína concreta, por ejemplo OCT4, activa otro conjunto de genes, que a su vez desencadena una nueva cascada de expresión de genes, y así sucesivamente. Ya hemos encontrado antes el gen OCT4, es el más importante de todos los genes utilizados por el profesor Yamanaka para reprogramar células somáticas. Estas cascadas de expresión de genes están asociadas con la modificación genética del genoma, y cambian las marcas del ADN y las histonas de modo que determinados genes se activen o desactiven adecuadamente. Esta es la secuencia de acontecimientos epigenéticos en la primerísima fase del desarrollo:

1. Los pronúcleos masculino y femenino (procedentes del espermatozoide y del óvulo respectivamente) transportan modificaciones epigenéticas.
2. Las modificaciones epigenéticas desaparecen del zigoto inmediatamente después de la fertilización.
3. Aparecen nuevas modificaciones epigenéticas (a medida que las células empiezan a diferenciarse).

Esto es un poco simplificador. Es cierto que los investigadores pueden detectar la desmetilación del ADN durante la fase 2 de esta lista. Pero las cosas son algo más complicadas que esto, particularmente por lo que respecta a las modificaciones de las histonas. Mientras que algunas modificaciones desaparecen, se establecen otras. Al mismo tiempo que desaparece la metilación represora del ADN, determinadas marcas de las histonas que reprimen la expresión de genes también desaparecen. También pueden producirse otras modificaciones de las histonas con una expresión de genes más intensa. Es por tanto demasiado simplificador referirse a estos cambios epigenéticos simplemente como la aparición y la desaparición de modificaciones epigenéticas. En realidad se produce una reprogramación del epigenoma.

Esta reprogramación es lo que John Gurdon demostró en su innovador trabajo cuando transfirió los núcleos de unos sapos adultos a unos óvulos de sapo. Es lo que se produjo cuando Keith Campbell e Ian Smith clonaron a la oveja Dolly inyectando el núcleo de una glándula de mamífero en un óvulo. Es lo que Yamanaka consiguió cuando trató células somáticas con cuatro genes clave, todos los cuales

codifican proteínas que se expresan abundantemente de modo natural durante esta fase de reprogramación.

El óvulo es un mecanismo maravilloso, afinado durante cientos de millones de años de evolución para ser extraordinariamente efectivo para generar grandes cantidades de cambio epigenético en miles de millones de pares de bases. Ninguno de los medios artificiales de reprogramación de las células puede compararse con el proceso natural por lo que respecta a su velocidad o eficacia. Pero el óvulo probablemente no hace casi nada sin ayuda. Como mínimo, el patrón de modificaciones epigenéticas en los espermatozoides es lo que permite al pronúcleo masculino reprogramarse de un modo relativamente fácil. El epigenoma del espermatozoide está preparado para ser reprogramado[6].

Desafortunadamente, estas modificaciones de la cromatina (y otros muchos rasgos del núcleo del espermatozoide) no se producen si un núcleo adulto es reprogramado transfiriéndolo a un óvulo fertilizado. Esto también es cierto cuando un núcleo adulto es reprogramado tratándolo con los cuatro factores de Yamanaka para crear células iPS. En ambas circunstancias, es realmente difícil restablecer completamente el epigenoma del núcleo adulto. Es una tarea sumamente compleja.

Probablemente por esto muchos animales clonados tienen anomalías y viven menos tiempo. Los defectos que se ven en estos animales clonados son otra demostración de que si las modificaciones epigenéticas tempranas son anómalas, pueden serlo siempre. Los patrones de modificación epigenética anómalos tienen como consecuencia una expresión de los genes permanentemente inapropiada, y a la larga una mala salud.

Toda esta reprogramación del genoma en el desarrollo temprano normal cambia el epigenoma de los gametos y crea el nuevo epigenoma del zigoto. Esto asegura que los patrones de expresión de los genes de óvulos y espermatozoides son sustituidos por los patrones de expresión de los genes del zigoto y de las subsiguientes fases de desarrollo. Pero esta reprogramación también tiene otra consecuencia. Las células pueden acumular modificaciones epigenéticas inapropiadas o anómalas en varios genes. Esto perturba la expresión normal del gen y puede incluso contribuir a producir la enfermedad, como veremos más adelante. La reprogramación del óvulo y del espermatozoide impide que pasen de padres a hijos las modificaciones epigenéticas inapropiadas que hayan acumulado. No es tanto borrar la pizarra y dejarla en blanco como reinstalar el sistema operativo.

Efectuando el cambio

Pero esto produce una paradoja. Los experimentos de Azim Surani mostraron que los pronúcleos masculino y femenino no son funcionalmente equivalentes; necesitamos uno de cada para crear un nuevo mamífero. Esto se conoce como el "efecto progenitor original" porque esencialmente muestra que hay formas de que un zigoto y sus células hijas distingan entre los cromosomas del padre y los de la madre. Este no es un efecto genético, sino epigenético, y por lo tanto tiene que haber modificaciones epigenéticas que se transmitan de una generación a la siguiente.

En 1987 el laboratorio Surani publicó uno de los primeros trabajos que abordaba el funcionamiento de este mecanismo. Formulaba la hipótesis de que los efectos del progenitor original podían ser causados por la metilación del ADN. En ese momento, esta era realmente la única modificación de la cromatina que había sido identificada, por lo que era un buen lugar para comenzar. Los investigadores crearon ratones genéticamente modificados. Estos ratones contenían un fragmento extra de ADN que podía insertarse aleatoriamente en cualquier parte del genoma. La secuencia de ADN de este fragmento extra no era particularmente importante para los experimentadores. Lo importante era que podían medir fácilmente la cantidad de metilación que estaba presente en esta secuencia y si esta se transmitía fielmente de padres a hijos.

Azim Surani y sus colegas examinaron siete líneas de ratones con esta inserción aleatoria. En una de las siete líneas ocurrió algo muy extraño. Cuando una madre pasaba el ADN a su descendencia, este estaba siempre muy metilado. Pero cuando era el padre el que lo pasaba, las crías siempre acababan con ese ADN poco metilado. La figura 7.3 lo muestra.

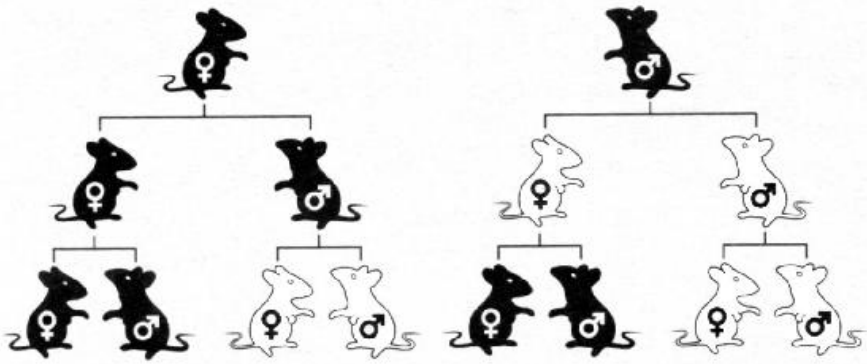

Figura 7.3: Ratones producidos en los que un fragmento particular del ADN había sido metilado o no. El color negro representa el ADN metilado y el blanco el no metilado. Cuando una madre pasaba este ADN extraño, este estaba siempre muy metilado (negro) en las crías, independientemente de si ella misma era 'blanca' o 'negra'. En el caso de los machos era todo lo contrario; sus crías siempre tenían ADN 'blanco', no metilado. Esta fue la primera demostración experimental de que algunas regiones del genoma pueden estar marcadas para indicar si han sido heredadas por vía materna o paterna.

El color negro representa el ADN metilado insertado, mientras que el blanco representa el ADN no metilado. Los padres siempre dan a sus hijos ADN blanco, no metilado, mientras que las madres siempre les dan ADN negro, metilado. Dicho de otro modo, la metilación en las crías depende del sexo del progenitor que les ha pasado el ADN insertado. No depende de cómo era la metilación en el progenitor. Por ejemplo, un macho 'negro' siempre tendrá crías con ADN "blanco".

Lo que el trabajo de Azim Surani[7] y otros trabajos publicados por la misma época[8] demostraban es que cuando los mamíferos crean óvulos y espermatozoides, consiguen de algún modo insertar una especie de código de barras en el ADN de estas células. Es como si los cromosomas llevasen pegada una pequeña etiqueta. Los cromosomas del espermatozoide llevan una que dice: "Yo soy de mi papi" y los del óvulo otra que dice: "Yo soy de mi mami." La metilación del ADN es el material del que están hechas estas etiquetas.

La descripción que se hace de esto es la de una "impronta" –los cromosomas han sido marcados con una información acerca de cuál es el progenitor del que provienen. La impronta y el "efecto progenitor original" son cosas que exploraremos con más detalle en el próximo capítulo.

¿Qué le pasaba al ADN externo que le hacía cambiar su estatus de metilación al ser transmitido de padres a hijos? Había sido insertado casi por casualidad en una región del ADN del ratón que llevaba una de estas etiquetas. A consecuencia de ello, el ADN externo también empezaba a llevar etiquetas de metilación pegadas cuando pasaba de

generación en generación.

El hecho de que solo una de las siete líneas de ratones mostrase este efecto sugería que no todo el genoma lleva estas etiquetas. Si todo el genoma estuviese marcado de esta forma, sería de esperar que todas las líneas sometidas al experimento hubiesen mostrado el mismo efecto. De hecho, el que solo fuera una de siete sugiere que estas regiones etiquetadas son la excepción, no la regla.

En el capítulo 6 veremos que a veces los animales heredan características adquiridas por sus padres. El trabajo de Emma Whitelaw, entre otros, nos muestra que algunas modificaciones epigenéticas se transmiten efectivamente de padres a hijos, por medio del espermatozoide y el óvulo. Este tipo de herencia es bastante raro, pero refuerza nuestra creencia en que tiene que haber modificaciones epigenéticas que son especiales. Modificaciones que no son sustituidas cuando el óvulo y el espermatozoide se fusionan para formar el zigoto. Así, aunque la mayor parte del genoma de los mamíferos es reiniciada cuando el óvulo y el espermatozoide se fusionan, un pequeño porcentaje del mismo permanece inmune a esta reprogramación.

La carrera armamentista epigenética

Solo un 2 por ciento de nuestro genoma codifica proteínas. Un 42 por ciento está compuesto de retrotransposones. Estos son secuencias muy antiguas de ADN que probablemente se originaron a partir de virus en nuestro pasado evolutivo. Algunos retrotransposones se transcriben para producir ARN y ello puede afectar a la expresión de genes vecinos. Esto puede tener serias consecuencias para las células. Si estimula la expresión de los genes que hacen proliferar a las células demasiado agresivamente, por ejemplo, puede hacer que se vuelvan cancerosas.

Hay una constante carrera armamentista en la evolución, y en nuestras células han evolucionado mecanismos para controlar la actividad de este tipo de retrotransposones. Uno de los principales mecanismos que utilizan las células es epigenético. El retrotransposón del ADN es metilado por la célula y desactiva la expresión del retrotransposón del ARN. Esto impide que el ARN perturbe la expresión de genes vecinos. Una clase particular, conocida como retrotransposones IAP parece ser un objetivo particular de este mecanismo de control.

Durante la reprogramación en el zigoto temprano, se elimina la metilación de la mayor parte de nuestro ADN. Pero los retrotransposones IAP son una excepción a esto. La maquinaria de la

reprogramación ha evolucionado para saltarse estos elementos defectuosos y dejar en ellos las marcas de la metilación del ADN. Esto mantiene a los retrotransposones en un estado epigenéticamente reprimido. Esto ha evolucionado probablemente como un mecanismo para reducir el riesgo que retrotransposones IAP potencialmente peligrosos sean accidentalmente reactivados.

Esto es relevante porque los dos ejemplos mejor estudiados de herencia transgeneracional de rasgos no genéticos son el ratón *agutí* y el ratón AxinFu, que hemos visto en el capítulo anterior. Los fenotipos de estos dos modelos son una consecuencia de los niveles de metilación de un retrotransposón IAP en la parte de arriba de un gen. Los niveles de metilación en el progenitor pasan a la descendencia y lo mismo hace el fenotipo causado por los niveles de expresión del retrotransposón[9].

En el capítulo 6 hemos encontrado otros ejemplos de herencia transgeneracional de caracteres adquiridos. Incluidos los efectos de la nutrición en generaciones subsiguientes, y los efectos transgeneracionales de sustancias ambientales contaminantes como la vinclozolina. Los investigadores están explorando la hipótesis de que estos estímulos medioambientales producen cambios epigenéticos en la cromatina de los gametos. Estas alteraciones se dan probablemente en regiones que están protegidas de la reprogramación durante el desarrollo temprano después de la fusión del espermatozoide y el óvulo.

Igual que John Gurdon, Azim Surani ha seguido trabajando de un modo muy productivo en un campo en el que fue un precursor. Su trabajo se ha centrado en estudiar cómo y por qué óvulos y espermatozoides ponen un código de barras a su ADN de modo que una cierta memoria molecular pase a la siguiente generación. Una buena cantidad del trabajo innovador inicial de Azim Surani dependía de la manipulación de núcleos de mamífero utilizando unas diminutas pipetas para transferirlos de una célula a otra. Técnicamente es una versión refinada de los métodos que John Gurdon había utilizado con tanto éxito quince años antes. Resulta curiosamente agradable considerar que el profesor Surani trabaja actualmente en el instituto de investigación en Cambridge que lleva el nombre del profesor Gurdon, y que frecuentemente se encuentran en alguno de sus pasillos o en la cafetería.

1. Surani, Barton y Norris (1984), Nature 308: 548:550.
2. Barton, Surani y Norris (1984), Nature 311: 374-376.
3. Surani, Barton y Norris (1987), Nature 326: 395-397.
4. McGrath y Solter (1984), Cell 37: 179-183.
5. Cattanach y Kirk (1985), Nature 315: 496-498.
6. Hammond et al. (2009), Nature 460: 473-478.

7. Reik et al. (1987), Nature 328: 248-251.
8. Sapienza et al. (1987), Nature 328: 251-254.
9. Rakyan et al. (2003), PNAS 100: 2.538-2.543.

Capítulo 8
La batalla de los sexos

Nadie ganará nunca la batalla de los sexos.
Hay demasiada fraternización con el enemigo.
Henry Kissinger

El insecto palo de laboratorio *Carausius morosus* es una mascota muy popular. Mientras tenga unas cuantas hojas de alheña para masticar, estará perfectamente satisfecho, y a los pocos meses empezará a poner huevos. A su debido tiempo, estos eclosionarán y de ellos saldrán unos insectos palo bebés que serán como versiones en miniatura de sus adultos. Si uno de estos insectos palo bebés es apartado de los demás en cuanto nace y puesto en un tanque propio, también él pondrá huevos que en su momento eclosionarán y de los que saldrán insectos palo bebés. Y ello pese a que jamás se habrá apareado.

Los insectos palo se reproducen frecuentemente de este modo. Utilizan una forma de reproducción llamada partenogénesis, del griego "nacimiento virginal". Las hembras ponen huevos fértiles sin aparearse con un macho, y de estos huevos salen pequeños insectos palo perfectamente sanos. Estos insectos han evolucionado con unos mecanismos especiales que garantizan que sus crías tengan el número correcto de cromosomas. Pero todos estos cromosomas proceden de la madre.

Esto es muy diferente de lo que hacen los ratones y los humanos, como vimos en el último capítulo. Para nosotros y para nuestros primos los roedores, la única forma de producir crías vivas es con el ADN de un padre y el de una madre. Resulta tentador especular con que los insectos palo son unos seres muy extraños en su forma de reproducirse. Pero no es cierto. Nosotros los mamíferos somos la excepción. Insectos, peces, anfibios, reptiles e incluso algunas aves tienen unas cuantas especies que pueden reproducirse partenogenéticamente. Somos nosotros los mamíferos los que no podemos hacerlo. En el mundo animal nuestra clase es la excepción, por lo que tiene sentido preguntarse por qué ello es así. Podemos empezar fijándonos en aquellas características que solo se encuentran en los mamíferos. Bueno, tenemos pelo y tenemos tres huesos en el oído medio. Ninguna de estas características se encuentra en las demás clases, pero parece improbable que estas sean las características clave que nos hayan llevado a abandonar el nacimiento virginal. Para esto hay una característica mucho más importante.

Los ejemplos más primitivos de mamíferos son el pequeño número de criaturas, como el ornitorrinco y el echidna o anteater espinoso, que ponen huevos. Después de ellos, en términos de complejidad reproductiva, vienen los marsupiales, como el canguro y el diablo de Tasmania, que dan a luz a unas crías muy subdesarrolladas. Las crías de estas especies pasan la mayor parte de las fases de su desarrollo fuera del cuerpo de la madre, en el marsupio. La bolsa o marsupio es una especie de bolsillo con pretensiones en el exterior del cuerpo.

Los más abundantes de lejos de nuestra clase son los llamados mamíferos placentarios (o euterios). Humanos, tigres, ratones, ballenas azules: todos alimentamos a nuestras crías del mismo modo. Nuestros hijos pasan por una fase de desarrollo realmente larga en el interior de la madre, en el útero. Durante esta fase del desarrollo, el feto toma su alimento a través de la placenta. Esta estructura en forma de crep hace de interfaz entre el sistema circulatorio del feto y el sistema circulatorio de la madre. De hecho, la sangre no fluye realmente de uno a otro. En vez de ello, los dos sistemas circulatorios pasan tan cerca uno de otro que nutrientes como los azúcares, las vitaminas, los minerales y los aminoácidos pueden pasar de la madre al feto. El oxígeno también pasa de la sangre de la madre al suministro de sangre del feto. A cambio, el feto se deshace de los gases residuales y de otras toxinas potencialmente nocivas depositándolas en el sistema circulatorio de la madre.

Es un sistema muy impresionante que permite a los mamíferos alimentar a sus crías durante largos períodos durante su desarrollo temprano. En cada embarazo se crea una nueva placenta, y el código para su producción no lo lleva la madre. Está todo codificado por el feto. Pensemos una vez más en nuestro modelo del blastocisto del capítulo 2. Todas las células del blastocisto son descendientes del zigoto fertilizado. Las células que finalmente se convertirán en la placenta son las células-pelota de tenis del exterior del blastocisto. De hecho, una de las primeras decisiones que toman las células en cuanto empiezan a rodar colina abajo por el paisaje epigenético de Waddington es si van a convertirse en futuras células placentarias o en futuras células corporales.

No podemos escapar de nuestro pasado (evolutivo)

Si bien la placenta es un método excelente para alimentar a un feto, el sistema tiene “problemas”. Utilizando una terminología propia del mundo de los negocios o de la política, decimos que hay un conflicto de intereses porque, en términos evolutivos, nuestros cuerpos se

enfrentan a un dilema.

Este es el imperativo evolutivo para el mamífero macho, expresado antropomórficamente:

> *Esta hembra embarazada lleva mis genes en forma de este feto. Puede que nunca me aparee con ella de nuevo. Quiero que mi feto sea lo más grande posible para que tenga el máximo de probabilidades de transmitir mis genes.*

Para el mamífero hembra, el imperativo es algo diferente:

> *Quiero que este feto sobreviva y transmita mis genes, pero no a costa de consumirme tanto que nunca pueda volver a reproducirme. Quiero tener más probabilidades que esta de transmitir mis genes.*

Esta batalla de los sexos en los mamíferos ha producido un empate evolutivo. Una serie de mecanismos de control compensatorios garantiza que ni el genoma materno ni el paterno se salga con la suya. Podemos entender mejor cómo funcionan estos mecanismos si nos fijamos una vez más en los experimentos de Azim Surani, Davor Sobel y Bruce Cattanach. Estos son los científicos que crearon los zigotos de ratón que contenían solo ADN paterno o ADN materno.

Una vez que hubieron creado estos zigotos de tubo de ensayo, los científicos los implantaron en úteros de ratona. Ningún laboratorio consiguió nunca producir ratones vivos a partir de estos zigotos. Sin embargo, los zigotos sí se desarrollaron durante un tiempo en el útero, aunque de forma muy anómala. El desarrollo anómalo fue muy diferente en función de si todos los cromosomas procedían de la madre o del padre.

En ambos casos los pocos embriones que se formaron eran pequeños y tenían un retraso en su crecimiento. Si todos los cromosomas procedían de la madre, los tejidos placentarios estaban muy subdesarrollados[1]. Si todos los cromosomas procedían del padre, el embrión estaba aún más retrasado, pero había una producción mucho mejor de tejido placentario[2]. Los científicos crearon embriones que eran una mezcla de estas células –células que tenían solo cromosomas heredados por vía materna o cromosomas heredados por vía paterna. Tampoco estos embriones pudieron desarrollarse hasta nacer. Al examinarlos, los investigadores encontraron que todos los tejidos del embrión procedían de las células solo maternas mientras que las células de los tejidos placentarios eran del tipo solo paterno[3].

Todos estos datos sugerían que algo en los cromosomas del macho empuja al programa de desarrollo en favor de la placenta, mientras

que un genoma derivado de la madre tiene menos tendencia a la placenta y más hacia el embrión propiamente dicho. ¿En qué sentido es esto consistente con el conflicto de imperativos evolutivos expuesto algo más arriba en este mismo capítulo? Bueno, la placenta es el portal para tomar nutrientes de la madre y transferirlos al feto. Los cromosomas de origen paterno promueven el desarrollo placentario y por lo tanto crean mecanismos para desviar tantos nutrientes como sea posible del torrente sanguíneo de la madre. Los cromosomas maternos actúan en sentido opuesto, y en los embarazos normales la partida acaba en tablas.

Una pregunta importante es la de si todos los cromosomas son importantes a estos efectos. Bruce Cattanach utilizó complejos experimentos genéticos en ratones para investigarlo. Los ratones contenían cromosomas que habían sido reorganizados de diferentes modos. La forma más simple de explicar esto es decir que cada ratón tenía el número adecuado de cromosomas, pero "pegados" de forma no habitual. Podía así crear ratones que tenían unas anomalías precisas en la herencia de sus cromosomas. Podía, por ejemplo, crear ratones que heredasen las dos copias de un cromosoma específico de un solo progenitor.

En los primeros experimentos que publicó había utilizado el cromosoma de ratón número 11. Para todos los demás pares de cromosomas, los ratones heredaron uno de cada par por vía materna, y uno por vía paterna. Pero para el cromosoma 11 Bruce Cattanach creó ratones que habían heredado dos copias de su madre y ninguna de su padre, o viceversa. La figura 8.1 representa los resultados[4].

Figura 8.1: Bruce Cattanach creó ratones genéticamente modificados en los que podía controlar cómo heredaban una región particular del cromosoma 11. El ratón del medio heredó una copia de cada progenitor. Las crías que heredaban las dos copias de su madre eran más pequeñas de lo normal. En cambio los ratones que heredaban las dos copias de su padre eran más grandes de lo normal.

Una vez más, esto es consistente con la idea de que hay factores en los cromosomas paternos que propenden al desarrollo de crías más grandes. Unos factores en los cromosomas maternos o bien actúan "en sentido opuesto" o son en general neutrales.

Como vimos en el capítulo anterior, estos factores son epigenéticos, no genéticos. En el ejemplo citado más arriba, vamos a suponer que los padres procedían de la misma cepa endogámica de ratones, por lo que serían genéticamente idénticos. Si secuenciásemos las dos copias del cromosoma 11 en cualquiera de los tres tipos de crías, serían exactamente iguales. Contendrían los mismos millones de bases de pares A, C, G y T, y en el mismo orden. Pero las dos copias del cromosoma 11 se comportan claramente de modo diferente a nivel funcional, como pone de manifiesto los diferentes tamaños de los diferentes tipos de crías. Por lo tanto, tiene que haber diferencias epigenéticas entre las copias materna y paterna del cromosoma 11.

Discriminación sexual

Debido a que las dos copias del cromosoma tienen un comportamiento diferente en función de su "progenitor original", el cromosoma 11 se conoce como un cromosoma con impronta, porque ha sido marcado con información acerca de sus orígenes. A medida que nuestra comprensión de la genética ha ido mejorando, nos hemos dado cuenta de que solo ciertos tramos del cromosoma 11 llevan esta impronta. Hay grandes regiones en las que no importa en absoluto qué

progenitor donó qué cromosomas, y las regiones procedentes de los dos progenitores son funcionalmente equivalentes. Hay también cromosomas enteros que no llevan impronta.

Hasta ahora hemos definido la impronta en términos principalmente fenomenológicos. Las regiones con impronta son tramos del genoma en los que es posible detectar efectos "progenitor original" en la descendencia. Pero ¿cómo transportan estas regiones el efecto? En las regiones con impronta, ciertos genes están activos o inactivos en función de cómo han sido heredados. En el ejemplo del cromosoma 11 más arriba citado, los genes asociados con el crecimiento de la placenta están activados y son muy activos en la copia del cromosoma heredada del padre. Esto conlleva el riesgo de una disminución de los nutrientes para la madre que lleva el feto, y por ello la evolución ha creado un mecanismo compensatorio. Las copias de estos mismos genes en el cromosoma materno tienden a estar inactivos y esto limita el crecimiento de la placenta. Alternativamente, puede haber otros genes que hagan de contrapeso a la acción de los genes paternos, y estos genes compensatorios puede que se expresen principalmente desde el cromosoma materno.

Se han producido importantes avances en la comprensión de la biología molecular de estos efectos. Por ejemplo, un grupo de investigadores ha estudiado una región del cromosoma 7 en ratones. Hay un gen en esta región llamado *factor de crecimiento insulínico 2* (*Igf2*). La proteína *Igf2* promueve el crecimiento del embrión y se expresa normalmente solo en la copia del cromosoma 7 derivada del padre. Los experimentadores introdujeron una mutación en este gen que interrumpía la codificación por parte del gen de una proteína *Igf2* funcional. Estudiaron los efectos de la mutación en las crías. Cuando la mutación la pasaba la madre, las crías tenían el mismo aspecto que otros ratones. Esto se debe a que de todos modos el gen *Igf2* se activa normalmente en el cromosoma materno, y por ello no importa que el gen materno esté mutado. Pero cuando el gen mutante *Igf2* lo pasaba el padre a las crías, los ratones de la camada eran mucho más pequeños de lo normal. Esto se debía a que la copia del gen *Igf2* en la que "confiaban" para tener un buen crecimiento fetal había sido desactivada por la mutación[5].

Hay un gen en el cromosoma 17 llamado *Igf2r*. La proteína codificada por este gen "sofoca" a la proteína *Igf2* y le impide actuar como promotor del crecimiento. El gen *Igf2r* también tiene impronta. Debido a que la proteína *Igf2r* tiene el efecto "opuesto" a *Igf2* en términos de crecimiento fetal, probablemente no tiene nada de sorprendente que el gen *Igf2r* se expresa normalmente desde la copia materna del cromosoma 17[6].

Los científicos han detectado unos 100 genes con impronta en

ratones, y aproximadamente unos 50 en humanos. No está claro si hay en realidad menos genes con impronta en los humanos que en los ratones, o si simplemente es más difícil detectarlos experimentalmente. El sistema de la impronta evolucionó hace unos 150 millones de años[7], y en realidad solo se da de una manera importante en los mamíferos placentarios. No se encuentra en aquellas clases que pueden reproducirse por partenogénesis.

La impronta es un sistema complicado, y como todo mecanismo complejo, puede averiarse. Actualmente sabemos que hay trastornos en los humanos causados por problemas con el mecanismo de la impronta.

Cuando la impronta falla

El síndrome de Prader-Willi (PWS) recibe su nombre de los dos autores que describieron por vez primera esta alteración genética[8]. El PWS afecta a uno de cada 20.000 niños nacidos vivos. Los niños tienen un peso corporal bajo al nacer y sus músculos son muy blandos. En los primeros días de vida puede ser difícil alimentarlos, e inicialmente no logran desarrollarse. Esto se invierte luego espectacularmente en la primera infancia. Los niños están constantemente siempre hambrientos, de modo que comen constantemente y pueden volverse peligrosamente obesos. Junto con otras características, como el hecho de tener unas manos y unos pies pequeños, retrasos en su desarrollo lingüístico e infertilidad, los individuos con PWS a menudo sufren un ligero o moderado retraso mental. También pueden tener trastornos de comportamiento, incluidos unos accesos extemporáneos de mal humor[9].

Hay otra alteración genética en los humanos que afecta aproximadamente al mismo número de personas que el PWS. Es el llamado síndrome de Angelman (AS), y al igual que el PWS recibe su nombre de la primera persona que lo describió[10]. Los niños con el AS sufren un retraso mental severo, tienen un cerebro pequeño y una capacidad lingüística reducida o nula. Los pacientes con este síndrome a menudo ríen espontáneamente sin el menor motivo, lo que ha llevado a la sumamente insensible descripción clínica de estos niños como “marionetas felices”[11].

Tanto en el PWS como en el AS, los padres de los niños afectados tienen una salud perfectamente normal. La investigación sugirió que el problema básico en cada una de estas alteraciones era probablemente causada por un defecto en los cromosomas. Debido a que los padres no se veían afectados, el defecto probablemente surgía durante la

producción de los óvulos o de los espermatozoides.

En los años 1980 los investigadores que estudiaban el PWS utilizaron una serie de técnicas estándar para descubrir la causa subyacente del síndrome. Buscaron regiones en el genoma que fuesen diferentes entre los niños sanos y los que sufrían la alteración. Los científicos interesados en el AS hicieron algo parecido. Hacia mediados de la década de los ochenta se hizo cada vez más evidente que ambos grupos estaban buscando, en la misma parte del genoma, un tramo concreto del cromosoma 15. Tanto en un síndrome como en el otro, los pacientes tenían una sección pequeña idéntica de este cromomosoma.

Pero estas dos alteraciones genéticas son muy diferentes en su presentación clínica. Nadie confundiría nunca a un paciente con el PWS con otro afectado por el síndrome de Angelman. ¿Cómo es posible que una misma alteración genética –la pérdida de una región clave del cromosoma 15– producir produzca síntomas tan diferentes?

En 1989 un grupo de investigadores del Hospital Infantil de Boston demostraron que lo importante no era solo la supresión del fragmento del cromosoma, sino la forma en que se heredaba esta alteración. Esto está resumido en la figura 8.2. Cuando el cromosoma anormal era heredado del padre, el hijo tenía el PWS. Y cuando la anomalía era heredada de la madre, el hijo tenía el AS[12].

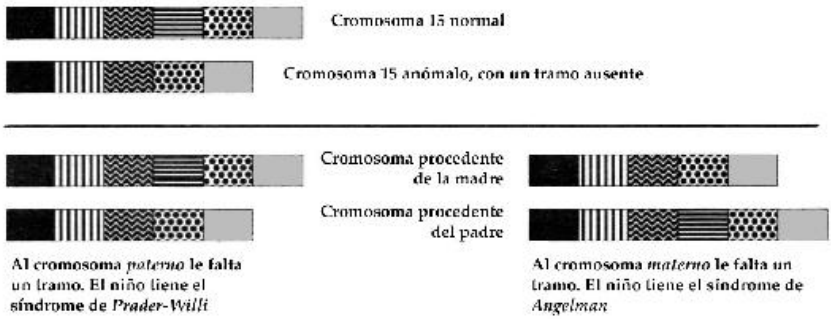

Figura 8.2: Dos niños pueden tener el mismo defecto en el cromosoma 15, mostrado esquemáticamente por la ausencia del recuadro con las rayas horizontales. El fenotipo de los dos niños será diferente, en función de cómo han heredado el cromosoma anómalo. Si el cromosoma anómalo lo han heredado del padre, el niño desarrollará el síndrome de Prader-Willi. Si lo ha heredado de la madre, desarrollará el síndrome de Angelman, que es una alteración muy diferente.

Este es un ejemplo claro de la herencia epigenética de una alteración. Los niños con el PWS y con el AS tienen exactamente el mismo problema genéticamente hablando –ambos carecen de una región específica del cromosoma 15. La única diferencia era cómo heredaban el cromosoma anómalo. Este es otro ejemplo del efecto "progenitor original".

Hay otra forma de que los pacientes hereden el PWS o el AS. Algunos pacientes con estas alteraciones tienen dos copias totalmente normales del cromosoma 15. No hay deleción ni mutaciones de ningún otro tipo, y sin embargo los niños desarrollan los síndromes. Para entenderlo, es útil volver a reflexionar sobre los ratones que heredaron las dos copias del cromosoma 11 de uno de los padres. Los mismos investigadores que desentrañaron el enigma de la deleción en el síndrome PWS pusieron de manifiesto que en ciertos ejemplos de esta alteración los niños tenían dos copias normales del cromosoma 15. El caso era que habían heredado los dos de su madre y ninguno de su padre. Esto se conoce como disomia uniparental –un solo padre aporta dos cromosomas[13]. En 1991, un equipo del Instituto de Salud Infantil de Londres mostró que algunos casos del AS eran causados por la forma opuesta de disomia uniparental del PWS. Los niños tenían dos copias normales del cromosoma 15, pero habían heredado ambos de su padre[14].

Esto reforzó la noción de que tanto el PWS como el AS eran dos ejemplos de alteraciones genéticas. Los niños con disomia uniparental del cromosoma 15 habían heredado exactamente la cantidad correcta de ADN, solo que no la habían heredado de cada padre. Sus células contenían todos los genes correctos, en las cantidades correctas, y sin embargo padecían esas dos graves alteraciones.

Es importante que heredemos esta pequeña región del cromosoma 15 de la forma correcta porque es una región que normalmente lleva impronta. Hay genes en esta región que solo se expresan del cromosoma paterno o del materno. Uno de estos genes es el *UBE3A*. Este gen es importante para el normal funcionamiento del cerebro, pero solo se expresa en el gen heredado por parte materna en este tejido. Pero ¿qué pasa si un niño no hereda una copia del *UBE3A* de su madre? Esto puede suceder si las dos copias del *UBE3A* vienen del padre, debido a la disomia uniparental del cromosoma 15. Alternativamente, el niño puede heredar una copia del cromosoma 15 de su madre que carezca del gen *UBE3A*, porque parte del cromosoma se haya perdido. En estos casos, el niño no puede expresar la proteína UBE3A en su cerebro y esto lleva al desarrollo de los síntomas del síndrome de Angelman.

A la inversa, hay genes que normalmente solo se expresan desde la versión paterna de este tramo del cromosoma 15. Esto incluye a un gen llamado *SNORD116*, pero otros también pueden ser importantes. Lo mismo puede decirse del gen *UBE3A*, pero sustituyendo "materno" por "paterno". Si un niño no hereda esta región del cromosoma 15 de su padre, desarrolla el síndrome de Prader-Willi.

Hay otros ejemplos de alteraciones relacionadas con la impronta en humanos. El más famoso es el síndrome de Beckwith-Wiedemann, también así llamado por quienes lo describieron en la literatura médica por primera vez[15,16]. Este trastorno se caracteriza por un crecimiento excesivo de los tejidos que hace que los niños crezcan con unos músculos superdesarrollados, incluida la lengua, y otros varios síntomas[17]. Esta alteración tiene un mecanismo ligeramente distinto a los descritos más arriba. Cuando la impronta falla en el síndrome de Beckwith-Wiedemann, tanto la copia materna como la paterna de un gen del cromosoma 11 se activan, cuando normalmente solo debería expresarse la versión derivada del padre. El gen clave en este caso parece ser *IGF2*, que codifica la proteína del factor de crecimiento que hemos visto antes en el cromosoma 7 del ratón. Expresando dos copias de este gen en vez de solo una, se produce el doble de lo normal de la proteína *IGF2*, y el feto crece demasiado.

El fenotipo opuesto al del síndrome de Beckwith-Wiedemann es el propio de una alteración conocida como síndrome de Silver-Russell[18,19]. Los niños con esta alteración se caracterizan por un crecimiento retardado antes y después de nacer y por otros síntomas asociados con el desarrollo posterior[20]. La mayor parte de casos de esta alteración también los causan varios problemas en la misma región del cromosoma 11 que en el síndrome de Beckwith-Wiedemann, pero en el síndrome de Silver-Russell la expresión de la proteína *IGF2* es inferior y el crecimiento del feto se amortigua.

La impronta epigenética

Así, la impronta se refiere a una situación en la que se da la expresiópn de solo un miembro de un par de genes, y la expresión puede ser materna o paterna. ¿Qué es lo que controla el gen que se activa? Probablemente no resultará nada sorprendente decir que la metilación del ADN juega un papel realmente importante en esto. La metilación del ADN desactiva a los genes. Por consiguiente, si una región del cromosoma heredada del padre es metilada, los genes de origen paterno de esta región serán desactivados.

Tomemos el ejemplo del gen *UBE3A* que ya encontramos en la discusión de los síndromes de Prader-Willi y Angelman. Normalmente, la copia heredada del padre contiene ADN metilado, y el gen está desactivado. La copia heredada de la madre no tiene esta marca de metilación, y el gen está activado. Algo parecido pasa con el gen *Igf2r* en ratones. La versión paterna del mismo está normalmente metilada, y el gen está inactivo. La versión materna es no metilada y el gen se expresa.

Si bien el hecho de que la metilación del ADN tuviese un rol no fue ninguna sorpresa, sí lo fue saber que a menudo no es el cuerpo del gen el que es metilado. La parte del gen que codifica la proteína es epigenéticamente la misma, a grandes rasgos, cuando comparamos las copias materna y paterna del cromosoma. Es la región del cromosoma que controla la expresión del gen la que está diferentemente metilada en los dos genomas.

Imagínese una fiesta nocturna de verano en el jardín de un amigo, agradablemente iluminado por unas velas diseminadas entre las plantas. Desgraciadamente, este bonito ambiente se ve constantemente arruinado porque el movimiento de los invitados activa una y otra vez un detector de movimiento del sistema de seguridad, que hace que se encienda un poderoso reflector. El reflector está situado en un muro demasiado elevado para cubrirlo, pero finalmente los invitados de la fiesta se dan cuenta de que no tienen por qué cubrir el reflector; basta con que cubran el sensor que hace que se ponga en marcha. Esto es más o menos lo que sucede con la impronta.

La metilación, o la ausencia de la misma, se da en regiones conocidas como ICRs (o “regiones de control de la impronta”, por sus siglas en inglés). En algunos casos, el control de la impronta es muy fácil de entender. La región promotora de un gen es metilada en el gen heredado de uno de los progenitores y no en el del otro. Esta metilación mantiene desactivado al gen. Esto sucede cuando hay un

solo gen en una región del cromosoma con impronta. Pero muchos genes con impronta están organizados en grupos, muy cerca uno del otro en un solo tramo del mismo cromosoma. Algunos de los genes del grupo se expresarán desde el cromosoma maternamente derivado y otros desde el cromosoma paternamente derivado. La metilación del ADN sigue siendo el rasgo clave, pero otros factores contribuyen a llevar a cabo su función.

La región de control de la impronta puede actuar a largas distancias, y algunos tramos pueden ligar proteínas grandes. Estas proteínas actúan como los controles de carretera de algunas ciudades y aíslan unos de otros a los diversos tramos de un cromosoma. Esto da al proceso de la impronta un nivel adicional de sofisticación, insertando desviaciones entre diferentes genes. Debido a ello, una región de control de la impronta puede operar sobre muchos miles de pares de bases, pero esto no significa que cada uno de los genes en estos miles de pares de bases se vea afectado del mismo modo. Diferentes genes en un tramo particular con impronta de la cromatina pueden enlazarse desde su cromosoma formando asociaciones físicas entre sí de modo que los genes desactivados se agrupen en una especie de nudo de cromatina. Los genes activados del mismo tramo de cromosoma pueden unirse en un haz diferente[21].

El impacto de la impronta varía de tejido en tejido. La placenta es particularmente rica en expresión de genes con impronta. Esto es lo que cabría esperar de nuestro modelo de impronta como forma de compensar la demanda de recursos maternos. El cerebro también parece ser muy susceptible a los efectos de la impronta. No está tan claro por qué esto tiene que ser así. Resulta difícil reconciliar el control de la expresión del gen por el progenitor de origen en el cerebro con la batalla por los nutrientes que hemos estado considerando. La profesora Gudrun Moore del University College de Londres ha hecho una sugerencia interesante. Ha propuesto que los altos niveles de impronta en el cerebro representan una continuación post-natal de la guerra de sexos. Ha especulado que algunas improntas del cerebro son un intento por parte del genoma paterno de promover una conducta en los hijos que estimule a la madre a continuar consumiendo sus propios recursos, por ejemplo mediante un amamantamiento prolongado[22].

El número de genes con impronta es bastante escaso, menos de un 1 por ciento de todos los genes que codifican proteínas. Y ni siquiera este pequeño porcentaje tendrá la impronta en todos los tejidos. En muchas células la expresión de las copias derivadas maternamente y paternamente será la misma. Esto no se debe a que el patrón de metilación sea diferente entre los tejidos, sino a que las células tienen diversas formas de “leer” esta metilación.

Los patrones de metilación del ADN en las regiones de control de la impronta están presentes en todas las células del cuerpo, y muestran qué progenitor ha transmitido qué copia de un cromosoma. Esto nos dice algo muy revelador acerca de las regiones con impronta. Tienen que eludir la reprogramación que tiene lugar después de que el óvulo y el espermatozoide se fusionen para formar el zigoto. De lo contrario, las modificaciones de la metilación serían anuladas y la célula no tendría forma de saber qué progenitor habría donado qué cromosoma. Del mismo modo que los retrotransposones IAP permanecen metilados durante la reprogramación del zigoto, la evolución ha creado mecanismos para proteger las regiones con impronta de esta eliminación general de la metilación. No está realmente muy claro cómo sucede esto, pero es esencial para un desarrollo normal y sano.

Tú pones la impronta, y tú la quitas…

Pero esto nos plantea un pequeño problema. Si las marcas de la metilación del ADN con impronta son tan estables, ¿cómo cambian al ser transmitidas de padres a hijos? Sabemos que lo hacen gracias a los experimentos con ratones de Azim Surani que vimos en el capítulo anterior.

De hecho, una vez que los científicos reconocieron que existen los efectos del progenitor original, predijeron que tenía que haber una forma de poner de nuevo a cero las marcas epigenéticas, incluso antes de saber en qué consistían estas marcas. Consideremos el cromosoma 15, por ejemplo. Yo he heredado una copia de mi padre y una de mi madre. La región de control de la impronta del *UBE3A* de mi madre no estaba metilada, mientras que la misma región del cromosoma de mi padre sí lo estaba. Esto garantizó unos patrones de expresión apropiados de la proteína *UBE3A* en mi cerebro.

Cuando mis ovarios producen óvulos, cada óvulo hereda solo una copia del cromosoma 15, que pasaré a un hijo. Dado que soy una mujer, cada copia del cromosoma 15 tiene que llevar una marca materna en el gen *UBE3A*. Pero una de mis copias del cromosoma 15 ha llevado la marca paternamente derivada que yo heredé de mi padre. La única forma en que puedo estar segura de que paso el cromosoma 15 con la marca materna correcta a mis hijos es que mis células sepan cómo eliminar la marca paterna y reemplazarla por una marca materna.

Un proceso muy similar tendría que tener lugar cuando los machos producen esperma. Todas las modificaciones maternamente derivadas tendrían que ser eliminadas de los genes con impronta, y los genes

paternamente derivados ocupar su lugar. Esto es exactamente lo que sucede. Es un proceso muy restringido que solo tiene lugar en las células que dan origen a la línea germinal.

El principio general se muestra en forma de diagrama en la figura 8.3.

Después de la fusión entre el óvulo y el espermatozoide se forma el blastocisto, y la mayoría de regiones del genoma son reprogramadas. Las células empiezan a diferenciarse formando los precursores de la placenta y también los diversos tipos de células del cuerpo. Así, en este punto las células que han formado parte de la ICM (masa celular interior) marchan al son que marca el desarrollo dirigiéndose a los diversos valles del paisaje epigenético de Waddington. Pero un número muy pequeño (menos de 100) empiezan a marchar siguiendo otro ritmo. En estas células, un gen llamado *Blimp1* se activa. La proteína *Blimp1* genera una nueva cascada de señales, que impide que las células se dirijan a su futuro somático. Estas células empiezan a remontar las zanjas de Waddington[23]. También pierden las marcas con impronta que le dicen a la célula qué progenitor les dio el cromosoma del par.

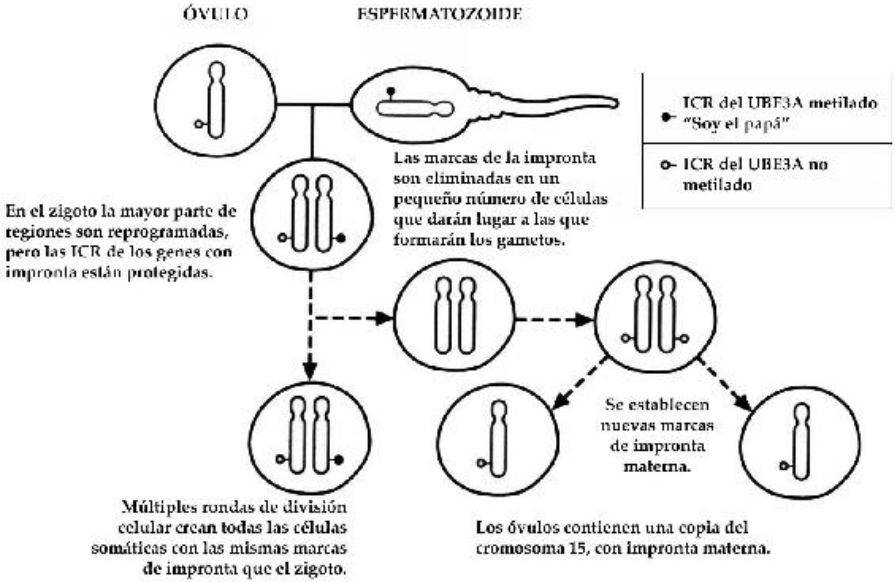

Figura 8.3: Este diagrama muestra cómo todas las células somáticas que surgen de un zigoto fertilizado llevan los mismos patrones de metilación del ADN que los otros en los genes con impronta, pero la metilación con impronta es eliminada y luego restablecida en las células germinales. Esto garantiza que solo las hembras pasen marcas maternas a su descendencia, y los machos solo marcas paternas.

La pequeña población de células que llevan a cabo este proceso se conocen como el grupo de las células células germinales primordiales. Son estas células las que finalmente se establecen en las gónadas en desarrollo (testículos y ovarios) y actúan como las células troncales que producen todos los gametos (espermatozoides u óvulos respectivamente). En la fase descrita en el párrafo anterior, las células germinales primordiales están revirtiendo a un estado más como el de las ICM. Esencialmente, se están volviendo pluripotentes y potencialmente capaces de codificar la mayor parte de tipos de tejido del cuerpo. Esta fase es breve. Las células germinales primordiales rápidamente derivan hacia una nueva senda de desarrollo en la que se diferencian para formar células troncales que darán lugar a óvulos o espermatozoides. Para ello, adquieren un nuevo conjunto de modificaciones epigenéticas. Algunas de estas modificaciones son las que definen la identidad celular, es decir, las que activan los genes que hacen un óvulo o un espermatozoide. Pero un pequeño número de ellas son las que sirven como marcas del progenitor de origen, de modo que en la siguiente generación las regiones con impronta del genoma pueden ser reconocidas con respecto a su progenitor de origen.

Esto parece terriblemente complicado. Si seguimos el camino desde

el espermatozoide que fertilizó al óvulo hasta un nuevo espermatozoide formándose en la descendencia masculina, la secuencia es la siguiente:

1. El espermatozoide que entra en el óvulo tiene modificaciones epigenéticas en él.
2. Las modificaciones epigenéticas son eliminadas, excepto en las regiones con impronta (en el zigoto inmediatamente posterior a la fertilización).
3. Las modificaciones epigenéticas son aplicadas (a medida que las células de la ICM empiezan a especializarse).
4. Las modificaciones epigenéticas son eliminadas, incluidas las de las regiones con impronta (a medida que las células germinales primordiales se apartan del camino de la diferenciación somática).
5. Las modificaciones epigenéticas son aplicadas (a medida que el espermatozoide se desarrolla).

Esta puede parecer una forma innecesariamente complicada de volver al punto de partida, pero es esencial.

Las modificaciones que hacen que un espermatozoide sea un espermatozoide, o que un óvulo sea un óvulo, tienen que desaparecer en la fase 2 o el zigoto no se convertiría en totipotente. En vez de ello tendría un genoma que estaría medio programado para ser un óvulo y medio programado para ser un espermatozoide. El desarrollo no sería posible si las modificaciones heredadas permanecieran. Para crear células germinales primordiales, algunas de las células de la ICM tienen que perder sus modificaciones epigenéticas. De este modo se vuelven temporalmente más pluripotentes, pierden sus marcas de impronta y se transfieren al linaje de las células germinales.

Una vez que las células germinales primordiales se han desviado, las modificaciones epigenéticas se adjuntan de nuevo al genoma. Esto se debe en parte a que las células pluripotentes son potencialmente muy peligrosas a medida que un organismo multicelular se desarrolla. Podría parecer una gran idea tener células en nuestro cuerpo que puedan dividirse repetidamente y dar lugar a otros muchos tipos de células, pero no lo es. Este es el tipo de células que encontramos en el cáncer. La evolución ha favorecido un mecanismo por el cual las células germinales primordiales pueden adquirir la pluripotencia por un período, pero luego esta pluripotencia es re-suprimida por modificaciones epigenéticas. Combinado con esto, el borrado de las improntas significa que los cromosomas pueden ser nuevamente marcados con su marca de progenitor original.

Ocasionalmente, este proceso de establecer nuevas improntas en los progenitores de óvulo y esperma puede salir mal. Hay casos del síndrome de Angelman y del síndrome de Prader-Willi en los que la impronta no ha sido propiamente borrada durante la fase de la célula

germinal primordial[24]. Por ejemplo, una mujer puede producir óvulos en los que el cromosoma 15 todavía lleve la marca paterna heredada del padre en vez de la marca materna correcta. Cuando este óvulo es fertilizado por un espermatozoide, las dos copias del cromosoma 15 funcionan como cromosomas paternos y crean un fenotipo igual al de la disomia uniparental.

Actualmente se investiga cómo se controlan todos estos procesos. No entendemos bien cómo las improntas se protegen de la reprogramación después de la fusión de óvulo y espermatozoide, ni cómo pierden esta protección durante la fase de célula germinal primordial. Tampoco estamos totalmente seguros de cómo se colocan de nuevo las improntas en el lugar correcto. El cuadro es bastante nebuloso, aunque poco a poco van emergiendo detalles entre la bruma.

Parte de ello puede tener que ver con el pequeño porcentaje de histonas que están presentes en el genoma del espermatozoide. Muchas de ellas están ubicadas en las regiones de control de la impronta, y es posible que protejan a estas regiones de la reprogramación cuando el óvulo y el espermatozoide se fusionan[25]. Las modificaciones de la histona también desempeñan un papel importante en el establecimiento de "nuevas" improntas durante la producción de los gametos. Parece importante que las regiones de control de la impronta pierdan todas las modificaciones de las histonas que estén asociadas con la activación de los genes. Solo entonces puede añadirse la metilación permanente del ADN[26]. Es esta metilación permanente del ADN la que marca a un gen con una impronta supresora.

Dolly y sus hijas

Los acontecimientos de la reprogramación en el zigoto y en las células germinales primordiales tienen un número sorprendente de fenómenos epigenéticos. Cuando las células somáticas son reprogramadas en el laboratorio utilizando los factores de Yamanaka, solo un pequeño porcentaje de ellas forma células iPS. Muy pocas de ellas parecen ser exactamente iguales a las células ES, las auténticas células pluripotentes de la masa celular interior del blastocisto. Un grupo de Boston, con base en el Hospital General de Massachusetts y en la Universidad de Harvard, evaluó células iPS y células ES de ratones genéticamente idénticas. Buscaban genes que variasen en expresión entre estos dos tipos de células. Las únicas diferencias importantes de expresión se encontraron en una región del

cromosoma conocida como *Dlk1-Dio3*[27]. Unas cuantas células iPS expresaban los genes de esta región de una forma muy similar a como lo hacían las células ES. Estas eran las mejores células iPS para formar todos los diferentes tejidos del cuerpo.

Dlk1-Dio3 es una región con impronta en el cromosoma 12 del ratón. Probablemente no tiene nada de extraño que una región con impronta resulte ser tan importante. La técnica Yamanaka desencadena el proceso de reprogramación que normalmente se produce cuando un espermatozoide se fusiona con un óvulo. Las regiones con impronta del genoma son resistentes a la reprogramación en el desarrollo normal. Es probable que constituyan una barrera demasiado alta a la reprogramación en el entorno artificial del método Yamanaka.

La región *Dlk1-Dio3* interesa a los investigadores desde hace tiempo. En los humanos, la disomia uniparental en esta región está asociada con defectos del crecimiento y el desarrollo, entre otros síntomas[28]. También se ha demostrado que esta región tiene una importancia crítica para la prevención de la partrenogénesis, por lo menos en ratones. Unos investigadores japoneses y de Corea del Sur manipularon genéticamente precisamente esta región del genoma de los ratones. Reconstruyeron un óvulo fertilizado con dos pronúcleos femeninos. La región *Dlk1-Dio3* en uno de los pronúcleos había sido alterada para que transportase el equivalente de una impronta paterna en vez de materna. Los ratones vivos que nacieron fueron el primer ejemplo de un mamífero placentario con dos genomas maternos[29].

La reprogramación que tiene lugar en las células germinales primordiales no es total. Deja más o menos intactos a algunos retrotransposones IAP. El nivel de metilación del ADN del retrotransposón AxinFuen los espermatozoides es el mismo que el de las células corporales en esta variedad de ratones. Esto pone de manifiesto que la metilación del ADN no desapareció cuando se reprogramaron las PGC, pese a que otras áreas del genoma perdieron esta modificación. La resistencia del retrotransposón AxinFu a ambas rondas de reprogramación epigenética (en el zigoto y en las células germinales primordiales) proporciona un mecanismo para la herencia transgeneracional del rasgo de la cola enroscada que vimos en capítulos anteriores.

Sabemos que no toda la herencia transgeneracional se produce del mismo modo. En el ratón agutí el fenotipo se transmite por vía materna, no paterna. En este caso, la metilación del ADN en el retrotransposón IAP es eliminada tanto en los machos como en las hembras durante la reprogramación normal de las células germinales primordiales. Sin embargo, las madres cuyos retrotransposones llevaban originalmente metilación en el ADN transmitieron una

específica marca de la histona a sus hijos. Esta es una modificación de la histona supresora y actúa como señal en la maquinaria de la metilación del ADN. Esta señal atrae a las enzimas que ponen la metilación del ADN supresora en una región concreta de un cromosoma. El resultado final es el mismo –la metilación del ADN en la madre es restaurada en las crías. Los ratones agutí machos no transmiten ni la metilación del ADN ni las modificaciones supresoras de las histonas, motivo por el cual la retransmisión del fenotipo solo se produce por medio de la línea materna[30].

Este es un método levemente más indirecto de transmitir información epigenética. En vez de un remanente indirecto de la metilación del ADN se utiliza un intermediario (una modificación supresora de la histona). Esta es probablemente la razón de que la transmisión materna del fenotipo agutí sea un tanto "borrosa". No todas las crías son exactamente iguales que la madre, porque se da un cierto margen de 'culebreo' en la forma en que la metilación del ADN es re-establecida en las crías.

El verano del 2010 la prensa británica publicó que se había conseguido clonar animales de granja. Carne procedente de las crías de una vaca clonada había penetrado en la cadena alimenticia humana[31]. No la propia vaca clonada, sino su descendencia, creada por el método de la cría animal convencional. Aunque hubo unos cuantos artículos alarmistas en la prensa sensacionalista acerca de personas que habían comido inadvertidamente *Frankenfood*[32], la información de la prensa generalista fue bastante equilibrada.

Hasta cierto punto, esto se debió probablemente a un fenómeno bastante enigmático, que ha disipado algunos de los temores originalmente albergados por los científicos acerca de las consecuencias de la clonación. Cuando los animales clonados se reproducen, las crías tienden a ser más sanas que los clones originales. Esto se debe casi ciertamente a la reprogramación de las células germinales primordiales. El clon inicial se forma por la transferencia de un núcleo somático a un óvulo. Este núcleo solo pasaba la primera ronda de reprogramación, la que normalmente tiene lugar cuando un espermatozoide fertiliza a un óvulo. Es probable que esta reprogramación epigenética no fuese totalmente efectiva –es una tarea muy compleja hacer que un óvulo reprograme un núcleo "erróneo". Es probable que esta sea la razón de que los clones tiendan a tener mala salud.

Cuando los animales clonados se reproducen, transmiten o bien un óvulo o bien un espermatozoide. Antes de que el clon produjese estos gametos, sus células primordiales experimentaron la segunda ronda de reprogramación, como parte de la senda normal de las células germinales primordiales. Esta segunda fase de reprogramación parece

reiniciar el epigenoma adecuadamente. Los gametos pierden las modificaciones epigenéticas anómalas de su progenitor clonado. La epigenética explica por qué los animales clonados tienen problemas de salud, pero también explica por qué sus crías no los tienen. De hecho, las crías son indistinguibles de los animales producidos de forma natural.

Las tecnologías de reproducción asistida en humanos (como la fertilización in vitro) comparten aspectos técnicos con algunos de los métodos utilizados en la clonación. En particular, los núcleos pluripotentes pueden transferirse entre células, y las células son cultivadas en el laboratorio antes de ser implantadas en el útero. Hay muchas controversias en las revistas científicas respecto a la cantidad de anomalías que se derivan del uso de estos procedimientos[33]. Hay autores que afirman que hay un número creciente de trastornos de la impronta en los embarazos hechos con tecnologías reproductivas. Esto implicaría que procedimientos como el cultivo de óvulos fertilizados fuera del cuerpo pueden perturbar las sendas delicadamente equilibradas que controlan la reprogramación, especialmente en las regiones con impronta. Es importante destacar, sin embargo, que no hay consenso acerca de si esta es una cuestión clínicamente relevante.

La reprogramación del genoma en el desarrollo temprano tiene múltiples efectos. Hace posible que dos tipos de célula muy diferenciadas se fusionen para formar una célula pluripotente. Compensa las exigencias enfrentadas de los genomas materno y paterno y garantiza que este equilibrio pueda restablecerse en cada generación. La reprogramación también impide que las modificaciones epigenéticas inapropiadas pasen de padre a hijo. Esto significa que aunque las células hayan acumulado cambios epigenéticos potencialmente peligrosos, estos serán eliminados antes de que puedan ser transmitidos. Esta es la razón de que normalmente no heredemos caracteres adquiridos por nuestros padres. Pero hay ciertas regiones del genoma, como los retrotransposones IAP, que son relativamente resistentes a la reprogramación. Si queremos averiguar cómo determinados caracteres adquiridos –la respuesta a la viclozolina o las respuestas a la nutrición paterna, por ejemplo– se transmiten de padres a hijos, estos retrotransposones pueden ser un buen lugar para comenzar a investigar.

1. Surani, Barton and Norris (1984), Nature 308: 548-550.
2. Barton, Surani and Norris (1984), Nature 311: 374-376.
3. Surani, Barton and Norris (1987), Nature 326: 395-397.
4. Cattanach and Kirk (1985), Nature 315: 496-498.
5. De Chiara et al. (1991), Cell 64: 845-859.
6. Barlow et al. (1991), Nature 349: 84-87.
7. Reseñado en Butler (2009), Journal of Assisted Reproduction and

Genetics: 477-486.
8. Prader, A., Labhart, A., y Willi, H. (1956), Schweiz Med Wschr. 86: 1.260-1.261.
9. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/176270
10. Angelman, H. (1965), "Puppewt children": a report of three cases. Dev Med Child Neurol. 7: 681-688.
11. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/105830
12. Knoll et al. (1989), American Journal of Medical Genetics 32: 285-290.
13. Nicholls et al. (1989), Nature 342: 281-285.
14. Malcolm et al. (1991), The Lancet 337: 694-697.
15. Wiedemann (1964), J Genet Hum. 13: 223.
16. Beckwith (1969), Birth Defects 5: 188.
17. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/130650.
18. Silver et al. (1953), Pediatrics 12: 368-376.
19. Russell (1954), Proc Royal Soc Medicine 47: 1.040-1.044.
20. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/180860
21. Para una reseña útil, véase Gabory et al. (2010), BioEssays 32: 473-480.
22. Frost y Moore (2010), PLoS Genetics 6 e1001015.
23. Ohinata et al. (2005), Nature 436: 207-213.
24. Buiting et al. (2003), American Journal of Medical Genetics 72: 571-577.
25. Hammoud et al. (2009), Nature 460: 473-478.
26. Ooi et al. (2007), Nature 448: 714-717.
27. Stadtfeld et al. (2010), Nature 465: 175-181.
28. Véase Butler (2009), J Assist Reprod Genet. 26: 477-486 para una reseña útil.
29. Kono et al. (2004), Nature 428: 860-864.
30. Blewitt et al. (2006), PLoS Genetics 2: 399-405.
31. Véase, por ejemplo, http://www.guardian.co.uk/uk/2010/1ug/04/ cloned-meat-british-bulls-fsa?INTCMP = SRCH
32. Término peyorativo utilizado por los que se oponen al consumo de alimentos derivados de plantas o animales genéticamente modificados, creado combinando las palabras *Franken* [por Frankenstein] y *food* [comida]. (N. del T.)
33. Para una reseña reciente, véase Bukulmez, O. (2009) Curr Opin Obstet Gynecol. 21: 260-4.

Capítulo 9
Generación X

El sonido de un beso no es tan fuerte como el de un cañón,
pero su eco resuena durante un tiempo mucho más largo.
Oliver Wendell Holmes

A un nivel puramente biológico, y especialmente a un nivel anatómico, los hombres son diferentes de las mujeres. Se debate si determinados comportamientos, desde la agresión al procesamiento de la percepción espacial, tienen un sustrato biológico. Pero hay ciertas características físicas que están inequívocamente ligadas al género. Una de las diferencias más fundamentales está en los órganos reproductivos. Las mujeres tienen ovarios y los hombres testículos. Las mujeres tienen una vagina y un útero, los hombres un pene.

Hay una base claramente biológica en ello, y tal vez de modo nada sorprendente tiene que ver con los genes y los cromosomas. Los humanos tenemos 23 pares de cromosomas en nuestras células, y heredamos uno de cada par de cada uno de nuestros progenitores. Veintidós de estos pares (poco imaginativamente llamados cromosoma 1, cromosoma 2… hasta cromosoma 22) se denominan autosomas y los dos miembros de cada par concreto de autosomas tienen un aspecto muy parecido. Y cuando digo "aspecto" quiero decir exactamente esto. En determinado momento de la división celular, el ADN de los cromosomas se enrosca de una manera excepcional. Utilizando las técnicas adecuadas podemos ver realmente los cromosomas en un microscopio. Y podemos fotografiarlos. Antes de la era digital, los genetistas clínicos solían literalmente cortar las fotografías de los cromosomas individuales con unas tijeras y luego los disponían en pares para crear una imagen perfectamente ordenada. Hoy en día las imágenes pueden procesarse con un ordenador, pero en ambos casos el resultado es una imagen de todos los cromosomas de una célula. Esta imagen se conoce como cariotipo.

Analizando los cariotipos fue como los científicos descubrieron originalmente que habría tres copias del cromosoma 21 en las células de las personas con síndrome de Down. Esto se conoce como la trisomía 21.

Cuando producimos un cariotipo humano a partir de la célula de una hembra, tenemos 23 pares de cromosomas idénticos. Pero si

creamos un cariotipo humano de la célula de un varón, la imagen es diferente, como podemos ver en la figura 9.1. Hay 22 pares obvios –los autosomas–, pero hay también otros dos cromosomas que no se parecen en nada. Uno es muy grande y el otro muy pequeño. Estos son los llamados cromosomas sexuales. El más grande es el cromosoma X y el más pequeño el cromosoma Y. La notación para describir la constitución normal de cromosomas de un varón humano es 46, XY. Las hembras se describen como 46, XX porque no tienen ningún cromosoma Y y en cambio tienen dos cromosomas X.

El cromosoma Y tiene muy pocos genes activos. Hay solo entre 40 y 50 genes que codifican proteínas en el cromosoma Y, la mitad de los cuales son específicamente masculinos. Los genes específicamente masculinos solo se dan en los cromosomas Y, por lo que las hembras no tienen copia de estos. Muchos de estos genes son necesarios para los aspectos específicamente masculinos de la reproducción. El más importante de ellos por lo que respecta a la determinación del sexo es un gen llamado SRY. Las proteínas SRY activan una senda determinadora de los testículos en el embrión. Esto lleva a la producción de testosterona, la hormona "masculina" arquetípica, que luego masculiniza al embrión.

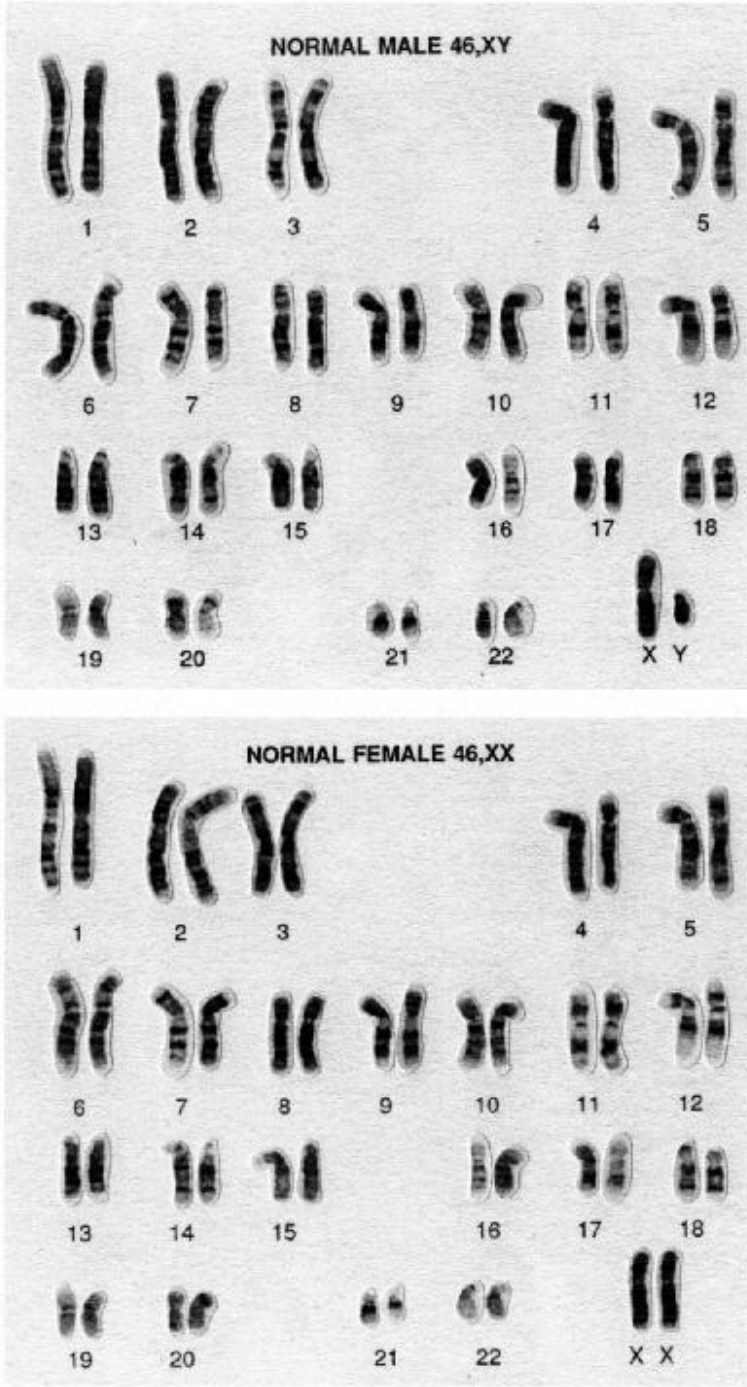

Figura 9.1: Cariotipo de todos los cromosomas en la célula somática de un macho (arriba) y una hembra (abajo). Nótese que la célula femenina contiene dos cromosomas X y ningún cromosoma Y; la célula masculina contiene un cromosoma X y un

cromosoma Y. Nótese también la diferencia sustancial de tamaño entre los cromosomas X e Y. Fotos: Wessex Reg Genetics Centre/Wellcome Images.

Ocasionalmente, individuos que fenotípicamente parecen mujeres tienen el cariotipo masculino 46, XY. En estos casos, el gen SRY está a menudo inactivo o anulado y en consecuencia el feto se desarrolla siguiendo la senda por defecto, que es la femenina[1]. A veces se produce el escenario contrario. Individuos que fenotípicamente parecen varones pueden tener el cariotipo típicamente femenino de 46, XX. En estos casos una pequeña sección del cromosoma Y que contiene el gen SRY es transferido a menudo a otro cromosoma durante la formación de esperma en el padre. Esto basta para provocar la masculinización del feto[2]. La región

del cromosoma Y transferida era demasiado pequeña para ser detectada en el proceso de creación del cariotipo.

El cromosoma X es muy diferente. El cromosoma X es extraordinariamente grande y contiene unos 1.300 genes. Un número desproporcionadamente elevado de estos genes están implicados en las funciones cerebrales. Muchos de ellos son también necesarios en las diversas fases de la formación de los ovarios o de los testículos, y en otros aspectos de la fertilidad tanto en machos como en hembras[3].

Obtener la dosis correcta

Así pues, el cromosoma X tiene unos mil trescientos genes. Esto plantea un problema interesante. Las hembras tienen dos cromosomas X y los varones solo tienen uno. Esto significa que de los 1.300 genes del cromosoma X, las hembras tienen dos copias y los varones solo una. Podríamos, por tanto, especular que las células femeninas producirán el doble de proteínas de estos genes (conocidos como genes vinculados al cromosoma X) que los varones.

Pero nuestro conocimiento de trastornos como el síndrome de Down hace que esto parezca bastante improbable. Tener tres copias del cromosoma 21 (en vez de las dos copias normales) produce el síndrome de Down, que es un trastorno importante en los individuos que nacen con esta circunstancia. Las trisomías de casi todos los demás cromosomas son tan severas que los fetos con esta alteración nunca llegan a nacer porque los embriones no se pueden desarrollar adecuadamente. Por ejemplo, nunca ha nacido un niño que tenga tenga tres copias del cromosoma 1 en todas sus células. Si el 50 por ciento de aumento en la expresión del gen de un autosoma puede causar estos problemas en los casos de trisomía, ¿cómo se explica el escenario del cromosoma X? ¿Cómo es posible que las hembras

sobrevivan cuando tienen el doble de genes en el cromosoma X que los varones? O, dicho de otro modo, ¿por qué los varones son viables si solo tienen la mitad de los genes del cromosoma X que las hembras?

La respuesta es que la expresión de los genes vinculados al cromosoma X es realmente la misma en varones y hembras, pese a la diferencia en el número de cromosomas, un fenómeno conocido como compensación de la dosis. El sistema XY de determinación del sexo no existe en otras clases de animales, así que la compensación de la dosis del cromosoma X se limita a los mamíferos placentarios.

A comienzos de los años 1960, una genetista británica llamada Mary Lyon postuló cómo podía producirse la compensación de la dosis en el cromosoma X. Estas fueron sus predicciones:

1. Las células de una hembra normal contendrían solo un cromosoma X activo.

2. La desactivación de X se produciría en una fase temprana del desarrollo.

3. El X inactivo podría ser materna o paternamente derivado, y la desactivación sería aleatoria en cualquier célula.

4. La desactivación de X sería irreversible en una célula somática y en todos sus descendientes.

Estas predicciones han demostrado ser extraordinariamente proféticas[4,5]. Tan proféticas, de hecho, que muchos libros de texto se refieren a la desactivación de X como lyonización. Estudiaremos las predicciones de una en una.

1. Las células individuales de una hembra normal solo expresan efectivamente genes de una copia del cromosoma X –la otra copia es desactivada.

2. La desactivación de X se produce en una fase temprana del desarrollo, la fase en la que las células pluripotentes de la masa celular interior del embrión están empezando a diferenciarse en diversos linajes (se encuentran cerca de la parte superior del paisaje epigenético de Waddington).

3. Por término medio, en un 50 por ciento de las células de una hembra el cromosoma Xx maternamente derivado está desactivado. En el otro 50 por ciento es el cromosoma heredado del padre el que se desactiva.

4.Una vez que una célula ha desactivado a uno de los miembros de un par de cromosomas X, esta copia particular de X permanece desactivada en todas las células hijas durante el resto de la vida de esta hembra (aunque viva más de cien años).

El cromosoma X no es desactivado por mutación; mantiene su secuencia de ADN intacta. La desactivación de X es el fenómeno epigenético por excelencia.

La desactivación de X ha demostrado ser un campo de investigación

sumamente fértil. Algunos de los mecanismos implicados han resultado tener paralelismos en otros procesos epigenéticos y celulares. Las consecuencias de la desactivación de X tienen implicaciones importantes para un número de trastornos humanos y para la clonación terapéutica. Y sin embargo, incluso ahora, cincuenta años después del trabajo pionero de Mary Lyon, permanecen en pie unos cuantos misterios acerca de cómo se produce realmente la desactivación de X.

Cuanto más consideramos la desactivación de X, más extreaordinaria parece. Para empezar, la desactivación se da solo en el cromosoma X, y no en ninguno de los autosomas, de modo que la célula tiene que tener una forma de distinguir a los cromosomas X de los autosomas. Además, la desactivación en el cromosoma X no afecta solo a uno o a unos cuantos genes, como ocurre en el caso de la impronta. No, en la desactivación de X más de mil genes son desactivados durante décadas.

Pensemos en un fabricante de automóviles con una planta de producción en Alemania y otra en Japón. La impronta sería el equivalente a unos cuantos cambios en las especificaciones de los diferentes mercados. La factoría alemana puede activar la máquina que instala el calefactor en el volante y desactivar el robot que introduce automáticamente el ambientador, mientras que la factoría japonesa puede hacer lo contrario. La desactivación de X es equivalente a cerrar la planta y a no volver a abrirla a menos que un nuevo fabricante adquiera la compañía.

Desactivación aleatoria

La otra gran diferencia entre la desactivación de X y la impronta es que no hay efecto progenitor original en la impronta de X. En las células somáticas es indiferente que un cromosoma X haya sido heredado del padre o de la madre. Todas tienen un 50 por ciento dce probabilidades de ser desactivadas. La razón de ello es perfectamente lógica desde un punto de vista evolutivo.

La impronta trata de equilibrar las demandas conflictivas de los genomas materno y paterno, especialmente durante el desarrollo. Los mecanismos de la impronta que ha creado la evolución están específicamente orientados a genes individuales, o a pequeños grupos de genes, que tienen particularmente influencia en el crecimiento fetal. Solo hay, a fin de cuentas, entre 50 y 100 genes con impronta en el genoma de los mamíferos.

Pero la desactivación de X opera a una escala mucho mayor. Es un

mecanismo para desactivar a más de mil genes, en masa y de forma permanente. Mil genes son muchos genes, aproximadamente un 5 por ciento del número total de genes codificadores de proteínas, por lo que siempre cabe la posibilidad de que un gen determinado del cromosoma X sufra una mutación. La figura 9.2 compara los resultados de la desactivación de X con impronta (a la izquierda) con la desactivación aleatoria de X (a la derecha). Por cuestiones de claridad, el diagrama ejemplifica solo una mutación en un gen paternamente heredado, con desactivación con impronta del cromosoma X maternalmente derivado.

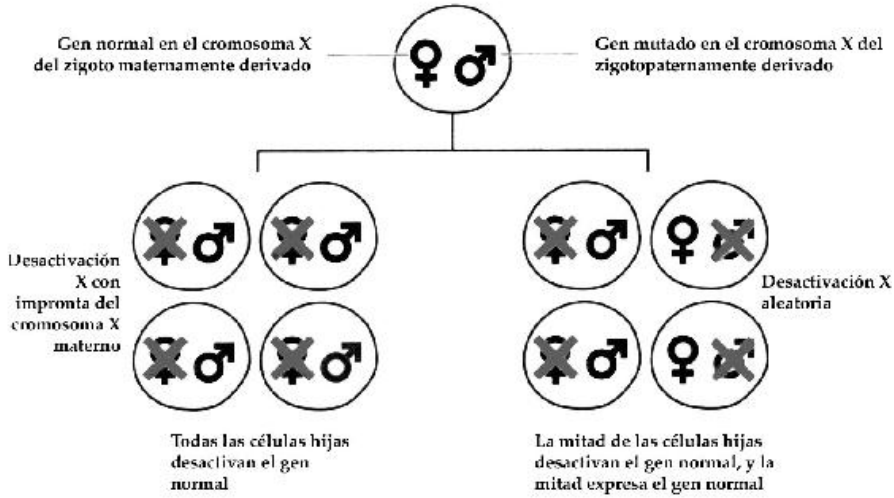

Figura 9.2: Cada círculo representa una célula femenina y contiene dos cromosomas X. El cromosoma X heredado de la madre es indicado por el símbolo femenino. El cromosoma X heredado del padre es indicado por el símbolo masculino y contiene una mutación denotada por la muesca cuadrada de color blanco. El lado izquierdo del diagrama demuestra que la desactivación con impronta del cromosoma X maternamente derivado tendría como resultado que todas las células del cuerpo expresarían solo el cromosoma X que llevase la mutación, heredada del padre. A la derecha, los cromosomas X están aleatoriamente desactivados, independientemente de su progenitor de origen. A consecuencia de ello, la mitad de las células somáticas de promedio expresarán la versión normal del cromosoma X. Esto hace que la desactivación aleatoria de X sea una estrategia evolutiva menos arriesgada que la desactivación de X con impronta.

Utilizando la desactivación *aleatoria* de X, las células pueden minimizar los efectos de las mutaciones en los genes vinculados a X.

Es importante tener en cuenta que el X inactivo está realmente inactivo. Casi todos los genes están permanentemente desactivados, y esta desactivación no puede normalmente deshacerse. Cuando nos referimos al cromosoma X activo estamos utilizando un atajo lingüístico ligeramente ambiguo. No significa que todos los genes del cromosoma X estén activos todo el tiempo en cada célula. Significa más bien que los genes tienen el potencial de estar activos. Están sometidos a todas las modificaciones epigenéticas y a todos los controles normales para la expresión de los genes, de modo que unos genes en concreto están activos o inactivos de una manera controlada, en respuesta a unas líneas de desarrollo o a unas señales ambientales.

Las mujeres son realmente más complicadas que los hombres

Una consecuencia interesante de la desactivación de X es que (epigenéticamente) las mujeres son más complicadas que los hombres. Los machos solo tienen un cromosoma X en sus células, por lo que no llevan a cabo la desactivación X. Pero las mujeres desactivan aleatoriamente un cromosoma X en todas sus células. En consecuencia, a un nivel muy fundamental, todas las células de un cuerpo femenino pueden dividirse en dos campos, en función de cuál de los dos cromosomas X desactivan. La forma de expresar esto es que las hembras son mosaicos epigenéticos.

Este sofisticado control epigenético en las hembras es un proceso complejo y altamente regulado, y es ahí donde las predicciones de Mary Lyon han proporcionado un marco conceptual muy útil. Podemos parafrasearlo en los siguientes cuatro pasos:

1. Recuento: las células de una hembra normal solo contendrían un cromosoma X activo.
2. Elección: la desactivación X ocurriría solo durante el desarrollo.
3. Iniciación: el cromosoma X inactivo puede ser materna o paternamente derivado, y la desactivación sería aleatoria en cualquier célula.
4. Mantenimiento: la desactivación X sería irreversible en una célula somática y en sus descendientes.

Desentrañar los mecanismos que hay detrás de estos cuatro procesos ha tenido ocupados a los investigadores durante casi 50 años, y este esfuerzo continúa hoy. Los procesos son increíblemente complicados y a veces implican mecanismos que apenas habían sido imaginados por ningún científico. Esto no es nada sorprendente, porque la lyonización es bastante extraordinaria –la desactivación X es un procedimiento por el que una célula trata a dos cromosomas idénticos de formas diametralmente opuestas y excluyentes.

Experimentalmente, la desactivación X es un auténtico reto para los investigadores. Es un sistema delicadamente equilibrado en las células, y unas variaciones muy leves en los métodos utilizados pueden tener un impacto importante en el resultado de los experimentos. También hay un considerable debate acerca de cuáles son las especies más adecuadas para estudiar. Las células de ratón han sido tradicionalmente utilizadas como el sistema experimental por excelencia, pero ahora nos estamos dando cuenta de que las células humanas y las de ratón no son idénticas por lo que respecta a la desactivación X[6]. Sin embargo, incluso teniendo en cuenta estas ambigüedades, ha empezado a surgir un cuadro fascinante.

Contando cromosomas

Las células de mamífero han de tener un mecanismo para contar cuántos cromosomas X contienen. Esto impide que el cromosoma X sea desactivado en las células masculinas. La importancia de esto la puso de manifiesto en los años 1980 Davor Solter. Solter creó embriones transfiriendo pronúcleos masculinos a óvulos fertilizados. Los varones tienen un cariotipo XY, y cuando producen gametos cada espermatozoide individual contiene un cromosoma X o un cromosoma Y. Tomando pronúcleos de diferentes espermatozoos e inyectándolos en óvulos "vacíos", era posible crear zigotos XX, XY o YY. Ninguno de estos dio lugar a nacimientos vivos, porque un zigoto requiere tanto *inputs* paternos como maternos, como ya hemos visto. Pero los resultados todavía nos dicen algo muy interesante, que resumimos en la figura 9.3.

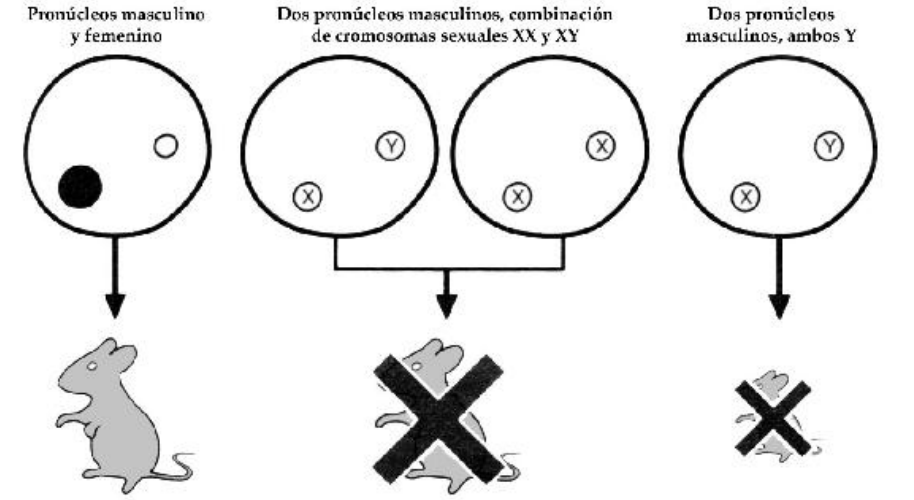

Figura 9.3: Se realizaron diversos experimentos de reconstitución de óvulos donantes en los que el óvulo donante recibía un pronúcleo masculino y otro femenino, o dos pronúcleos masculinos. Igual que en la Figura 7.2, los embriones derivados de dos pronúcleos masculinos no llegaron a desarrollarse hasta el final. Cuando cada núcleo contenía un cromosoma Y y ningún cromosoma X, los embriones se malograron en una fase muy temprana. Los embriones derivados de dos pronúcleos masculinos en los que al menos uno de ellos contenía un cromosoma X se desarrollaron más que aquellos antes de morir.

La pérdida más temprana de embriones se produjo en aquellos que habían sido reconstituidos a partir de dos pronúcleos masculinos cada uno de los cuales contenía un cromosoma Y como único cromosoma sexual[7]. En estos embriones no había ningún cromosoma X, y esto estaba asociado con un fallo excepcionalmente temprano del desarrollo. Esto pone de manifiesto que el cromosoma X es claramente esencial para la viabilidad del embrión. Esta es la razón de que las células masculinas (XY) necesitan poder contar para poder reconocer que contienen solamente un cromosoma X y de este modo evitar desactivarlo. Desactivar el solitario cromosoma X sería desastroso para la célula.

Una vez contado el número de cromosomas X, tiene que haber un mecanismo en las células femeninas por el que uno de los cromosomas X sea aleatoriamente seleccionado para su desactivación. Una vez seleccionado un cromosoma, la célula inicia el procedimiento de desactivación.

La desactivación X tiene lugar pronto en la embriogénesis femenina, cuando las células de la ICM empiezan a diferenciarse en los diferentes tipos de células del cuerpo. Experimentalmente, es difícil trabajar con el pequeño número de células disponibles en cada blastocisto, por lo que los investigadores suelen utilizar células ES femeninas. Los dos

cromosomas X están activos en estas células, igual que en la indiferenciada ICM. Es fácil hacer rodar las células ES por el paisaje epigenético de Waddington, simplemente alterando sutilmente las condiciones en que se cultivan las células en el laboratorio. En cuanto cambiamos las condiciones para estimular la diferenciación de las células ES femeninas, estas empiezan a desactivar un cromosoma X. Debido a que las células ES pueden cultivarse en el laboratorio de forma casi ilimitada, esto proporciona un sistema modelo muy conveniente para estudiar la desactivación X.

Pintando un cuadro con una calificación X

Las primeras intuiciones sobre la desactivación X surgieron del estudio de ratones y líneas celulares con cromosomas estructuralmente reorganizados. En algunos de estos estudios se echaron en falta varias secciones de un cromosoma X. En función de qué partes del mismo faltaban, el cromosoma X se desactivaba normalmente o no. En otros estudios, algunas secciones del cromosoma X se habían desprendido para unirse a un autosoma. Y dependiendo de la parte del cromosoma que se había transferido, podía producirse la desactivación del autosoma estructuralmente anómalo[8,9].

Estos experimentos pusieron de manifiesto que había una región en el cromosoma X que era vital para la desactivación X. Esta región fue bautizada como Centro de Desactivación X. En 1991, un grupo del laboratorio Hunt Willard de la Universidad de Stanford en California mostró que el Centro de Desactivación X contenía un gen al que llamaron *Xist* (por 'X-inactive (Xi) specific transcript'[10].10 Este gen se expresaba solo desde el cromosoma X inactivo, no desde el activo. Debido a que el gen se expresaba solo desde uno de los dos cromosomas X, esto le convertía en un atractivo candidato a controlador de la desactivación X, en la que dos cromosomas idénticos se comportan de forma no idéntica.

Se hicieron intentos de identificar la proteína codificada por el gen *Xist*[11], pero en 1992 quedó claro que estaba pasando algo muy extraño. El gen *Xist* se transcribía para formar copias de ARN. Este ARN se procesaba como cualquier otro ARN. Formaba un empalme y diversas estructuras se añadían a cada uno de los extremos de la transcripción para mejorar su estabilidad. Hasta aquí, todo normal. Pero antes de que las moléculas de ARN puedan codificar una proteína tienen que salir del núcleo y entrar en el citoplasma de la célula. Esto se debe a que los ribosomas –las factorías intracelulares que empalman aminoácidos para formar largas cadenas proteínicas– solo

están en el citoplasma. Pero el *Xist* del ARN nunca salió del núcleo, y por tanto no podía producir ninguna proteína[12,13].Esto clarificó al menos algo que había desconcertado a la comunidad científica cuando se identificó por vez primera el gen *Xist*. El ARN del *Xist* maduro es una molécula larga, de unos 17.000 pares de bases (17kb). Un aminoácido es codificado por un codón de tres pares de bases, como hemos descrito en el capítulo 3. Por consiguiente, en teoría, los 17.000 pares de bases del *Xist* tendrían que poder codificar una proteína de unos 5.700 aminoácidos. Pero cuando los investigadores analizaron la secuencia del *Xist* con programas de predicción de proteínas, simplemente no pudieron ver cómo podía codificar algo tan largo. Había codones stop (los codones que señalan la terminación de una proteína) en toda la secuencia del *Xist* y el tramo más largo predicho sin codones stop soloo bastaba para codificar 298 aminoácidos (894 pares de bases[14]) ¿Por qué habría creado la evolución una transcripción de 17kb para utilizar tan solo un 5 por ciento de la misma para codificar proteínas? Este habría sido un uso muy ineficiente de energía y recursos por parte de una célula.

Pero dado que el *Xist* nunca sale del núcleo, su falta de potencial para codificar proteínas es irrelevante. El gen *Xist* no actúa como ARN mensajero (ARNm) que transmite el código de una proteína. Es una clase de molécula llamada ARN no codificante (ARNnc). *Xist* no puede codificar ninguna proteína, pero esto no significa que no tenga ninguna actividad. En realidad, el propio ARNnc del *Xist* actúa como una molécula funcional, y es fundamental para la desactivación X.

En 1992 el ARNnc era una auténtica novedad, y en aquella época solo se conocía otro igual. Incluso ahora, hay algo fuera de lo corriente en el gen *Xist*. No es solo que no salga del núcleo. Ni siquiera sale del cromosoma que lo produce. Cuando las células ES empiezan a diferenciarse, solo uno de los cromosomas produce ARN *Xist*. Este es el cromosoma que será desactivado. *Xist* no sale del cromosoma que lo produjo. En vez de ello, se aferra al cromosoma y empieza a propagarse junto a él.

La acción de *Xist* se describe a menudo como “pintar” el X inactivo, y es una buena descripción. Volvamos de nuevo a nuestra analogía del código del ADN como un guión. Esta vez vamos a imaginar que el guión está escrito en forma de algoritmo en la pared de un aula. Al final del curso el edificio de la escuela cierra y el solar es vendido para construir un bloque de apartamentos. Llegan los decoradores y pintan la pared tapando el algoritmo. Pero las instrucciones que lo forman siguen estando allí, solo que no están a la vista.

Cuando *Xist* se liga al cromosoma X que lo produjo provoca una especie de parálisis epigenética que va cubriendo cada vez más genes, desactivándolos. Al principio parece hacerlo actuando como barrera

entre los genes y las enzimas que normalmente los copian en el ARNm. Pero a medida que la desactivación X se va estableciendo, cambia las modificaciones epigenéticas del cromosoma. Las modificaciones de las histonas que normalmente activan los genes son borradas y reemplazadas por unas modificaciones de las histonas supresoras que desactivan los genes.

Algunas de las histonas normales desaparecen totalmente. La histona H2A es reemplazada por una molécula relacionada con ella pero sutilmente diferente llamada macroH2A, fuertemente asociada con la supresión de genes. Los promotores de los genes experimentan la metilación del ADN, una forma aún más estricta de desactivar los genes. Todos estos cambios llevan a ligar cada vez más moléculas represoras, que cubren el ADN del X inactivo y lo hacen cada vez menos accesible a las enzimas que transcriben genes. Finalmente, el ADN del cromosoma X se va apretando de manera increíble, como una gigantesca toalla húmeda retorcida por sus extremos, y el cromosoma entero se desplaza hasta el borde del núcleo. En esta fase la mayor parte del cromosoma X está completamente inactiva, excepto por el gen *Xist*, que es un pequeño oasis de actividad en medio de un desierto transcripcional[15].

Cada vez que una célula se divide, las modificaciones del X inactivo se copian de la célula madre a la célula hija, y de este modo el mismo X permanece inactivo en todas las generaciones subsiguientes de esta célula inicial.

Si bien los efectos de *Xist* son increíbles, la descripción que hemos hecho más arriba deja un montón de preguntas sin responder. ¿Cómo se controla la expresión de *Xist*? ¿Por qué se activa cuando las células ES empiezan a diferenciarse? ¿Es *Xist* funcional solo cuando está en células femeninas o también puede actuar en las masculinas?

El poder de un beso

La última pregunta se formuló por vez primera en el laboratorio de Rudi Jaenisch, a quien hemos encontrado en el capítulo 2 en el contexto de las células iPS y el trabajo de Shinya Yamanaka. En 1996, el profesor Jaenisch y sus colegas crearon unos ratones que llevaban una versión genéticamente manipulada del Centro de Desactivación X (un Centro de Desactivación X transgénico). Este tenía un tamaño de 450 kb e incluía el gen *Xist* más otras secuencias a cada lado. Lo insertaron en un autosoma (un cromosoma no sexual), crearon ratones machos que llevaban este transgen y estudiaron las células ES de estos ratones. Los ratones machos solo contenían un cromosoma X normal,

porque tienen el cariotipo XY. Sin embargo, tenían dos Centros de Desactivación X. Uno de ellos estaba en el cromosoma X normal, y el otro en el transgen del autosoma. Cuando los investigadores diferenciaron las células ES de estos ratones encontraron que el gen *Xist* podía expresarse en cualquiera de los Centros de Desactivación X. Cuando *Xist* se expresaba desactivaba al cromosoma desde el que se había expresado, aunque este fuese el autosoma que llevaba el transgen[16].

Estos experimentos pusieron de manifiesto que incluso células que son normalmente masculinas (XY) pueden contar sus cromosomas X. En realidad, concretando más, pusieron de manifiesto que podían contar sus Centros de Desactivación X. Los datos también demostraron que todos los rasgos fundamentales para contar, elegir e iniciar estaban presentes en los 450kb del Centro de Desactivación X del gen *Xist*.

Ahora sabemos algo más del mecanismo para contar cromosomas. Normalmente las células no cuentan sus autosomas. Las dos copias del cromosoma 1, por ejemplo, operan independientemente. Pero sabemos que las dos copias del cromosoma X en una célula ES femenina se comunican de algún modo entre sí. Cuando la desactivación X está en marcha, los dos cromosomas X de una célula hacen algo muy extraño.

Se besan.

Esta es una forma muy antropomórfica de describir el fenómeno, pero es una buena descripción. El “beso” solo dura un par de horas más o menos, y resulta asombroso pensar que esto pone en marcha un patrón que puede persistir en las células durante los próximos cien años, si una mujer vive tanto tiempo. Este besuqueo cromosómico lo señaló por vez primera en 1996 Jeannie Lee, que había empezado su carrera como investigadora de postdoctorado en el laboratorio de Rudi Jaenisch y que actualmente imparte clases como profesora en la Harvard Medical School, donde fue uno de los profesores más jóvenes jamás contratados. Lee mostró esencialmente que las dos copias del cromosoma X se encuentran y establecen contacto físico. Este contacto físico afecta solo a una fracción realmente pequeña del cromosoma, pero es esencial para desencadenar la desactivación[17]. Si no se produce, el cromosoma X asume que está solo en la célula, *Xist* nunca llega a activarse y no hay desactivación X. Esta es una fase clave en el conteo de cromosomas.

Fue también el laboratorio de Jeannie Lee el que identificó uno de los genes fundamentales que controlan la expresión de *Xist*[18]. El ADN tiene forma de doble hélice, con las bases en medio uniendo entre sí a los dos ramales. Aunque a menudo nos la imaginamos con aspecto de doble vía de tren, es mejor hacerlo como los cables de dos teleféricos que avanzan en direcciones opuestas. Si utilizamos esta metáfora,

entonces el Centro de Desactivación X tiene un aspecto como el de la figura 9.4.

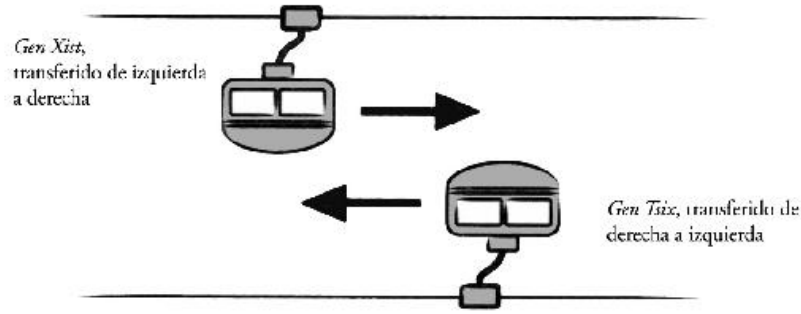

Figura 9.4: Las dos hebras del ADN en una ubicación concreta del cromosoma X pueden copiarse para crear moléculas de ARNm. Los dos ramales se copian en direcciones opuestas permitiendo que la misma región del cromosoma X produzca ARN *Xist* y ARN *Tsix*.

Hay otro ARN no codificante de unos 40kb de longitud en el mismo tramo de ADN que el *Xist*. Se solapa con este pero en el ramal opuesto de la molécula de ADN. Se transcribe en ARN en dirección contraria a *Xist* y se conoce como una transcripción antisentido. Su nombre es *Tsix*. El lector perspicaz se habrá dado cuenta de que *Tsix* es *Xist* escrito al revés, lo que tiene una curiosa lógica.

Este solapamiento en la ubicación de *Tsix* y *Xist* es realmente significativo respecto a su forma de interactuar, pero hace que sea sumamente complicado llevar a cabo experimentos concluyentes. El motivo es que es muy difícil mutar uno de los genes sin mutar a su compañero en el ramal opuesto, una especie de daño colateral. Pese a ello se han hecho grandes avances en la comprensión de cómo *Tsix* influye en *Xist*.

Si un cromosoma X expresa *Tsix*, ello impide la expresión del *Xist* del mismo cromosoma. Curiosamente, puede que sea la simple acción de transcribir *Tsix* lo que impide la expresión de *Xist*, más que el propio ARNnc de *Tsix*. Esto es análogo a una cerradura de caja y espiga. Si cierro la cerradura desde el interior de mi casa y dejo la llave en ella, mi compañero de piso no podrá abrir la puerta desde el exterior de la casa. No necesito cerrar la puerta, solo dejando la llave en la cerradura impido la acción de quien pretenda abrir la puerta desde el otro lado. Así, cuando *Tsix* está activo, *Xist* se desactiva y el cromosoma está activo.

Esta es la situación en las células ES, donde los dos cromosomas X están activos. Una vez que las células ES empiezan a diferenciarse, uno de los pares deja de expresar *Tsix*. Esto permite la expresión de *Xist* desde este cromosoma X, que provoca la desactivación de X.

Tsix, por sí solo, probablemente no es suficiente para mantener reprimido a *Xist*. En las células ES las proteínas Oct4, Sox2 y Nanog se

ligan al primer intrón de *Xist* y reprimen su expresión[19]. Oct4 y Sox2 son dos de los cuatro factores utilizados por Shinya Yamanaka para reprogramar células somáticas a células pluripotentes tipo iPS. Experimentos subsiguientes mostraron que Nanog (que recibe su nombre de la mítica tierra celta de la eterna juventud) también puede funcionar como factor reprogramador. Oct4, Sox2 y Nanog están altamente expresadas en células indiferenciadas como las células ES, pero sus niveles de expresión caen a medida que las células empiezan a diferenciarse. Cuando esto sucede en las células ES femeninas, Oct4, Sox2 y Nanog dejan de ligarse al intrón *Xist*. Esto elimina algunas de las barreras a la expresión de *Xist*. A la inversa, cuando las células somáticas femeninas son reprogramadas con el método Yamanaka, el cromosoma X inactivo es reactivado[20]. El otro único

momento que el cromosoma X inactivo es reactivado es durante la formación de las células germinales primordiales en el desarrollo, que es el motivo de que el zigoto empiece con dos cromosomas X activos.

Todavía no tenemos del todo claro por qué la desactivación X es tan mutuamente excluyente entre el par de cromosomas. Una teoría sostiene que todo se debe a lo que sucede cuando los dos cromosomas se besan. Esto sucede en el momento del desarrollo en el que los niveles de *Tsix* empiezan a caer, y los niveles de los factores de Yamanaka empiezan también a disminuir. La teoría es que el par de cromosomas llegan a una especie de compromiso. En vez de acabar los dos con una cantidad subóptima de ARN no codificante y otros factores, todas las moléculas ligantes son derivadas hacia uno de los dos miembros del par. No está muy claro cómo sucede esto. Es posible que uno de los cromosomas lleve por casualidad una cantidad algo mayor de uno de los factores clave. Esto lo hace ligeramente más atractivo para ciertas proteínas. Se forman así unos complejos autosuficientes, de modo que cuanta mayor es la complejidad con que empieza un cromosoma, más puede debilitar a su compañero. El rico se enriquece y el pobre se empobrece…

Es notable las muchas lagunas que siguen que haya tantas lagunas por llenar en nuestro conocimiento de la desactivación X cincuenta años después del trabajo formativo de Mary Lyon. Ni siquiera entendemos realmente cómo el ARN de *Xist* acaba cubriendo el cromosoma desde el cual se expresa, o cómo recluta todas estas enzimas y modificaciones epigenéticas negativas y supresoras. Tal vez ha llegado ya la hora de que salgamos de estas arenas movedizas y nos aposentemos en terreno más sólido.

Volvamos a la afirmación que hemos hecho al comienzo de este capítulo: “Una vez que una célula ha desactivado a uno de los miembros de un par de cromosomas X, esta copia particular de X permanece desactivada en todas las células hijas durante el resto de la

vida de esta hembra, aunque viva más de cien años." ¿Cómo lo sabemos? ¿Cómo podemos estar tan seguros de que la desactivación X es estable en las células somáticas? Actualmente es posible llevar a cabo manipulaciones genéticas para mostrar esto en especies como el ratón. Pero mucho antes de que esto fuera factible los científicos estaban bastante seguros de que esto era lo que sucedía. Para esta información en concreto hemos de dar las gracias a los gatos, no a los ratones.

Aprendiendo del gato epigenético

Y no a cualquier tipo de gato, sino concretamente a los gatos persas de pelaje de carey. Probablemente el lector sabe cómo reconocer a uno de estos gatos. Es el que tiene una mezcla de manchas de color negro y rojo anaranjado, a veces sobre un fondo blanco. El color de cada uno de los pelos del pelaje de un gato lo causan los melanocitos, las células que producen pigmentos. Los melanocitos se encuentran en la piel y se desarrollan a partir de unas células troncales especiales. Cuando las células troncales de los melanocitos se dividen las células hijas permanecen unas cerca de otras formando un pequeño grupo de células clonadas de la misma célula troncal.

Y ahora viene lo sorprendente: si un gato tiene el pelaje de este color parecido a la concha de una tortuga, es una hembra.

Hay un gen para el color del pelaje que codifica un pigmento o bien negro o bien anaranjado. Este gen se encuentra en el cromosoma X. Un gato puede recibir la versión negra del gen en el cromosoma X heredado de la madre y la versión anaranjada en el cromosoma X heredado del padre (o viceversa). La figura 9.5 muestra lo que pasa a continuación.

Así pues, el gato persa de pelaje de carey acaba teniendo manchas de color naranja y manchas de color negro en función del cromosoma X que ha sido aleatoriamente desactivado en la célula troncal del melanocito. Este patrón cromático no cambia cuando el gato envejece, sino que permanece igual durante toda su vida. Esto nos dice que la desactivación X se mantiene en las células que crean este patrón de pelaje.

Sabemos que los gatos de pelaje de carey son siempre hembras porque el gen que determina el color del pelaje se encuentra en el cromosoma X, no en el Y. Un gato macho solo tiene un cromosoma X, por lo que puede tener el pelo negro o anaranjado, pero no de ambos colores.

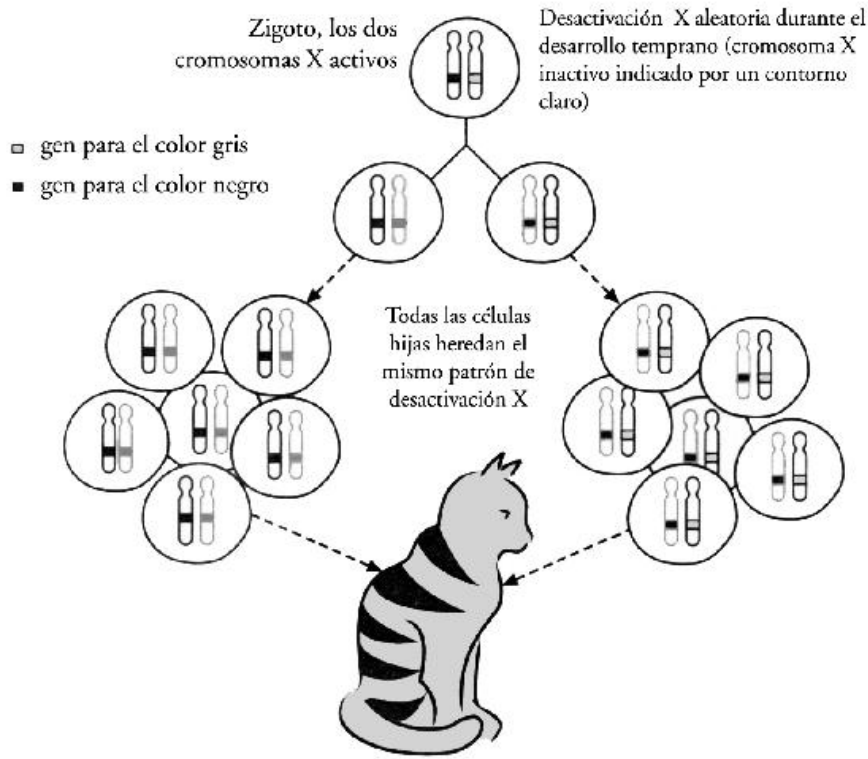

Figura 9.5: En las gatas de pelaje de carey, los genes para el pelaje naranja y negro se encuentran en el cromosoma X. En función del patrón de desactivación del cromosoma X en la piel, grupos clónicos de células dan lugar a patrones discretos de pelaje negro y naranja.

Algo parecido pasa en un trastorno humano poco frecuente llamado displasia ectodérmica hipohidrótica ligado al cromosoma X. Este síntoma lo causan las mutaciones en un gen del cromosoma X llamado *ECTODISPLASINA-A*[21].Un varón con una mutación en su única copia de *ECTODISPLASINA-A* en su único cromosoma X tiene una variedad de sín- tomas, incluida una falta total de glándulas sudoríparas. Esto puede parecer socialmente ventajoso, pero en realidad es increíblemente peligroso. Sudar es una de las principales formas que tenemos de liberar calor, y los hombres que padecen esta alteración corren un serio peligro de sufrir daños en los tejidos o incluso de morir a causa de un golpe de calor[22].

Las hembras tienen dos copias del gen *ECTODISPLASINA-A*, una en cada uno de sus cromosomas X. En los portadores femeninos de displasia ectodérmica hipohidrótica, uno de los cromosomas X lleva una copia normal del gen y el otro una versión mutada. Se producirá una desactivación aleatoria de un cromosoma X en diferentes células.

Esto significa que algunas células expresarán una copia normal de *ECTODISPLASINA-A*. Otras células desactivarán aleatoriamente el cromosoma X que lleva la copia normal del gen. Y no podrán expresar la proteína *ECTODISPLASINA-A*. Debido a la forma clónica en que se desarrollan las áreas de la piel, igual que en el gato de pelaje de carey, estas mujeres tienen unas zonas de piel que expresan la *ECTODISPLASINA-A* y otras que no la expresan. Allí donde no hay *ECTODISPLASINA-A*, la piel no puede formar glándulas sudoríparas. En consecuencia, estas mujeres tienen zonas de la piel que pueden sudar y enfriarse, y zonas que no pueden hacerlo.

La desactivación X aleatoria puede influir significativamente en cómo las hembras se ven afectadas por las mutaciones en los genes del cromosoma X. Esto depende no solo del tipo de gen que se muta sino también de los tejidos que expresa y requiere la proteína codificada por este gen. La enfermedad conocida como mucopolisacaridosis tipo II (MPSII) la causan unas mutaciones en el gen *LISOSOMAL IDURONATO-2-SULFATASA* en el cromosoma X. Los chicos con esta mutación en su único cromosoma X no pueden descomponer las moléculas grandes, y estas se acumulan en las células hasta alcanzar niveles tóxicos. Entre los principales síntomas están las infecciones en las vías respiratorias, una baja estatura y la dilatación del bazo y el hígado. Los chicos severamente afectados también sufren retraso mental y pueden morir en la adolescencia.

Normalmente, las hembras con una mutación en el mismo gen son perfectamente sanas. La proteína *LISOSOMAL IDURONATO-2-SULFATASA* es normalmente secretada por la célula que la produce y absorbida por las células vecinas. En esta situación no importa demasiado qué cromosoma X ha mutado en una célula determinada. Por cada célula que ha desactivado el cromosoma X con la versión normal del gen, es muy probable que haya otra célula cerca que haya desactivado el otro cromosoma X y que esté secretando la proteína. De esta forma, todas las células acaban con una cantidad suficiente de la proteína *LISOSOMAL IDURONATO-2-SULFATASA*, tanto si la producen ellas mismas como si no[23].

La distrofia muscular de Duchenne es una grave enfermedad causada por unas mutaciones en el gen de la DISTROFINA. Este es un gen muy grande que codifica una proteína que actúa como amortiguador en las fibras musculares. Los chicos que tienen ciertas mutaciones en el gen de la DISTROFINA sufren graves pérdidas musculares que normalmente producen la muerte en la adolescencia. Normalmente, las hembras con la misma mutación no manifiestan ningún síntoma. La razón de ello es que los músculos tienen una estructura muy poco habitual. Se conoce como tejido sincitial, y significa que muchas células individuales se fusionan y actúan casi

como una sola célula gigante pero con muchos núcleos discretos. Es por ello que la mayor parte de las mujeres que tienen una mutación en el gen *DISTROFINA* no manifiestan síntomas. Hay una cantidad suficiente de proteína *DISTROFINA* normal codificada por los núcleos que desactivaron el gen mutado de la *DISTROFINA* para que este tejido sincitial funcione de forma sana[24].

De vez en cuando este sistema falla. En un caso de gemelas monozigóticas, una de las gemelas se vio gravemente afectada por la distrofia muscular de Duchenne y la otra estaba perfectamente sana[25]. En la gemela afectada, la desactivación X se había desviado. En un momento temprano en la diferenciación de los tejidos la mayor parte de las células que iban a dar lugar a músculo desactivaron el cromosoma X que llevaba la copia normal del gen de la *DISTROFINA*. De este modo, la mayor parte del tejido muscular de esta mujer expresaba solamente la versión mutada de la *DISTROFINA*, por lo que desarrolló una distrofia muscular severa. Esto podría considerarse como la demostración definitiva del poder de un fenómeno epigenético aleatorio. Dos individuos idénticos, cada uno de ellos con dos cromosomas X aparentemente idénticos, tenían fenotipos totalmente discordantes debido a un cambio en el equilibrio epigenético de fuerzas.

A veces, sin embargo, es esencial que células individuales expresen la cantidad correcta de una proteína. El lector recordará que en el capítulo 4 dijimos que el síndrome de Rett solo afectaba a las chicas. Podría decirse que los chicos son de algún modo muy resistentes a los efectos de la mutación *MeCP2*, pero en realidad es lo contrario. El gen *MeCP2* está en el cromosoma X, por lo que un feto masculino que herede una mutación del síndrome de Rett en este gen no tiene forma de expresar la proteína *MeCP2* normal. Una falta total de expresión de la proteína *MeCP2* en el desarrollo temprano es generalmente letal, y es por ello que son muy pocos los niños que nacen con síndrome de Rett. Las niñas tienen dos copias del gen MeCP2, una en cada cromosoma. En cada célula hay un 50 por ciento de probabilidades de que la célula desactive el cromosoma X que lleva el gen *MeCP2* no mutado y de que la célula no exprese la proteína *MeCP2* normal. Aunque un feto femenino puede llegar a desarrollarse, normalmente cuando un número sustancial de neuronas carecen de proteína *MeCP2*, ello tiene consecuencias importantes en el desarrollo y en el funcionamiento cerebral post-natal.

Uno, dos, muchos

Hay otros tejidos que pueden desarrollarse en torno al cromosoma X. Una de las preguntas que tenemos que contestar acerca de la desactivación X es lo buenas que son contando las células de los mamíferos. El año 2004, Peter Gordon, de la Columbia University, en Nueva York, publicó los estudios que había llevado a cabo en la tribu de los Pirahã en una región aislada del Brasil. Esta tribu tenía palabras para referirse al uno y al dos, pero cualquier cantidad superior la describían con una palabra más o menos equivalente a "muchos'[26]. ¿Son nuestras células como los Pirahã, o son capaces de contar más allá de dos? Si un núcleo contiene más de dos cromosomas X ¿puede reconocerlo la maquinaria de la desactivación X y tener en cuenta las consecuencias? Diversos estudios han puesto de manifiesto que sí puede hacerlo. Esencialmente, sea cual sea el número de cromosomas X (o más estrictamente, sea cual sea el número de Centros de Desactivación X) presentes en un núcleo, la célula puede contarlos y luego desactivar a múltiples cromosomas X hasta que solo uno de ellos permanece activo.

Es por ello que en los humanos es relativamente frecuente tener un número anormal de cromosomas X, a diferencia de la frecuencia de anomalías en el número de autosomas. Los ejemplos más comunes se muestran en la tabla 9.1.

Nombre del síndrome	Cariotipo, o sea, número de cromosomas	Género	Frecuencia de nacimientos (casos conocidos, probablemente menos de los reales)	Síntomas comunes
Turner	45, X	Hembra	1 de cada 2.500	Baja estatura Infertilidad Cuello palmeado Anomalías en los riñones
Trisomía X	47, XXX	hembra	1 de cada 1.000	Talla alta Infertilidad Rasgos faciales anómalos Hipotonía
Klinefelter	47, XXY	Macho	1 de cada 1.000	Tipo corporal larguirucho o rechoncho Infertilidad Déficits de lenguaje

Tabla 9.1: Resumen de las características principales de las anomalías más comunes en el número de cromosomas sexuales en humanos.

La infertilidad, que es una característica de todas estas alteraciones, se debe en parte a problemas que aparecen en el momento de producir

óvulos o espermatozoides, momento en que es importante que los cromosomas se alineen bien. Si hay un número total irregular de cromosomas sexuales esta fase se desarrolla de forma incorrecta y la formación de gametos se ve gravemente comprometida.

Dejando aparte la infertilidad, son dos las conclusiones obvias que podemos deducir de esta tabla. La primera es que todos los fenotipos son relativamente leves comparados, por ejemplo, con la trisomía del cromosoma 21 (síndrome de Down). Esto sugiere que las células pueden tolerar tener demasiadas o no suficientes copias del cromosoma X mucho mejor que tener copias extras de un autosoma. Pero las otras conclusiones obvias es que un número anormal de cromosomas X tiene efectivamente consecuencias en el fenotipo.

¿Por qué tiene que ser así? Al fin y al cabo, la desactivación X garantiza que independientemente del número de cromosomas presentes, todos menos uno son desactivados durante el desarrollo. Pero si esto fuera todo, no habría diferencias fenotípicas entre las mujeres con un cariotipo 45,X y las mujeres con un cariotipo 47,XXX o con la constitución femenina normal 46,XX. De modo parecido, los varones con el cariotipo normal 46,XY tendrían que ser fenotípicamente idénticos a los varones con el cariotipo 47,XXY. En todos estos casos tendría que haber solo un cromosoma X activo en las células.

Una posible explicación de por qué las personas con estos cariotipos eran clínicamente diferentes era que tal vez la desactivación X es poco eficiente en algunas células, pero este no parece ser el caso. La desactivación X se establece muy pronto durante el desarrollo y es el más estable de todos los procesos epigenéticos. Se requería una explicación alternativa.

La respuesta hay que buscarla hace 150 millones de años, cuando se desarrolló por vez primera el sistema XY de determinación del sexo en los mamíferos placentarios. Los cromosomas X e Y son probablemente descendientes de unos autosomas. El cromosoma Y ha cambiado espectacularmente, el cromosoma X no tanto[27]. Sin embargo, ambos conservan restos de su pasado autosómico. Hay regiones, tanto en el cromosoma X como en el Y, llamadas regiones seudoautosómicas. Los genes de estas regiones se encuentran tanto en el cromosoma X como en el cromosoma Y, del mismo modo que los pares de autosomas tienen los mismos genes en las mismas posiciones, uno heredado de cada progenitor.

Cuando un cromosoma X se desactiva, estas regiones seudoautosómicas no se ven afectadas. Esto significa que, a diferencia de la mayor parte de genes ligados a X, los que se encuentran en estas regiones seudoautosómicas no son desactivados. En consecuencia, las células normales expresan potencialmente dos copias de cada gen en

todas las células. Las dos copias se expresan o bien desde los dos cromosomas X de una hembra normal o bien desde el cromosoma X y el cromosoma Y de un varón normal.

Pero en el síndrome de Turner la hembra afectada solo tiene un cromosoma X, por lo que solo expresa una copia de los genes de la región seudoautosómica, la mitad de lo normal. En la trisomía X, por otro lado, hay tres copias de los genes en las regiones seudoautosómicas. Por consiguiente, las células de una región afectada producirán proteínas de estos genes un 50 por ciento por encima de lo normal.

Uno de los genes en las regiones seudoautosómicas del cromosoma X es el gen SHOX. Los pacientes con mutaciones en este gen son bajos de estatura. Es probable que esta sea también la razón de que los pacientes con síndrome de Turner tiendan a ser bajos –no producen suficiente proteína SHOX en sus células. En cambio, los pacientes con trisomía X producen un 50 por ciento más de lo normal de proteína SHOX, y esta es probablemente la razón de su elevada estatura[28].

No son solo los humanos los que tienen trisomías de los cromosomas sexuales. El lector puede un día sorprender a sus amigos afirmando con seguridad que si tienen un gato persa de pelaje de carey está seguro de que es hembra, y cuando ellos traten de bajarle los humos diciéndole que el veterinario comprobó su sexo y les aseguró que era un macho, podrá sonreír con aire de suficiencia y soltarles: “Bueno, en este caso es un gato con un cariotipo anormal. Tiene un cariotipo XXY en vez de un XY.” Y si quiere rematar la cosa con un toque más de malicia puede añadir que además su gato es infértil. Eso debería bastar para hacerles callar.

1. Jäger et al. (1990), Nature 348: 452-4.
2. Para una buena reseña, véase Graves (2010), Placenta, Supplement A Trophoblast Research 24: S27-S32.
3. Margarit et al. (2000), American Journal of Medical Genetics 90: 25-8.
4. Lyon, M.F. (1961), Nature 190: 372-373.
5. Lyon, M.F. (1962), American Journal of Human Genetics 14: 135-148.
6. Para una reseña útil, véase Okamoto y Heard (2009), Chromosome Res. 17: 659-69.
7. McGrath y Solter (1984), Cell 37: 179-83.
8. Cattanach y Isaacson (1967), Genetics 57: 231-246.
9. Rastan y Robertson (1985), J Embryol Exp Morphol. 90: 379-88.
10. Brown et al. (1991), Nature 349: 38-44.
11. Borsanti et al. (1991), Nature 351: 325-329.
12. Brown et al. (1992), Cell 71: 527-542.
13. Brockdorff et al. (1992), Cell 71: 515-526.

14. Borsiani et al. (1991), Nature 351: 325-328.
15. Para una buena reseña, véase Lee, J. T. (2010), Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 2 a003749.
16. Lee et al. (1996), Cell 86: 83-84.
17. Xu et al. (2006), Science 311: 1.149-52.
18. Lee et al. (1999), Nature Genetics 21: 400-404.
19. Navarro et al. (2008), Science 321: 1.693-1.695.
20. Maherali et al. (2007), Cell Stem Cell 1: 55-70.
21. Zonana et al. (1993), Amer J Human Genetics 52: 78-84.
22. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/305100
23. Reseñado en Pinto et al. (2010), Orphanet Journal of Rare Diseases 5: 14-23.
24. http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/310200
25. Pena et al. (1987), J Neurol Sci. 79: 337-344.
26. Gordon (2004), Science 306: 496-499.
27. Para una buena reseña de esto, véase Graves (2010), Placenta, Supplement A Trophoblast Research 24: S27-S32.
28. Rao et al. (1997), Nature Genetics 16: 54-63.

Capítulo 10
El mensaje no es el medio

La ciencia comete un suicidio cuando adopta un credo.
Thomas Henry Huxley

Uno de los libros más influyentes en el ámbito de la filosofía de la ciencia es el de Thomas Kuhn *La estructura de las revoluciones científicas*, publicado en 1962. Una de las afirmaciones que se encuentran en el libro de Kuhn es que la ciencia no procede de una forma lineal, ordenada y cortés, con todos los nuevos descubrimientos vistos de una forma completamente ecuánime. En vez de esto, de hecho hay siempre una teoría preponderante en cada campo. Cuando aparecen nuevos datos conflictivos, la teoría no es inmediatamente derribada. Puede que se tambalee levemente, pero los científicos a menudo continúan creyendo en una teoría mucho tiempo después de que haya pruebas suficientes para descartarla.

Podemos visualizar la teoría como un cobertizo, y los nuevos datos conflictivos como un trozo de material de construcción de forma extraña pegado con cemento en el tejado. Probablemente podemos seguir pegando trozos igual de extraños en el tejado durante un tiempo, pero finalmente llegará un momento en que el tejado se hundirá por el simple peso de tantos trozos de material. Esto mismo es lo que pasa en la ciencia cuando se desarrolla una nueva teoría, y todos los trozos de material que han contribuido a hundir el techo del cobertizo se utilizan para construir los fundamentos de un nuevo cobertizo.

Kuhn describió este proceso de derrumbamiento y reconstrucción como un "cambio de paradigma", introduciendo una frase que ha acabado convirtiéndose en un cliché en los medios de comunicación relacionados con la ciencia. El cambio de paradigma no se basa solo en la pura racionalidad. Comporta también cambios emocionales y sociológicos en la psique de los defensores de la teoría dominante. Muchos años antes de la publicación del libro de Thomas Kuhn, el gran científico alemán Max Planck, que obtuvo el premio Nobel de Física en 1918, lo expresó de una forma mucho más sucinta al escribir que "las teorías científicas no cambian porque los científicos viejos cambien de opinión; cambian porque los científicos viejos se acaban muriendo"[1].

En estos momentos estamos precisamente en medio de uno de estos cambios de paradigma en biología.

En 1965 el premio Nobel de Fisiología o Medicina se otorgó a François Jacob, André Lwoff y Jacques Monod "por sus descubrimientos relativos al control genético de la síntesis de enzimas y virus". Incluido en su trabajo estaba el descubrimiento del ARN mensajero (ARNm), con el que ya nos hemos encontrado en el capítulo 3. El ARNm es la molécula de vida relativamente breve que transfiere la información desde nuestro ADN cromosómico y que actúa como la plantilla intermedia para la producción de proteínas.

Sabemos desde hace años que hay otras clases de ARN en nuestras células, concretamente las moléculas llamadas ARN de transferencia (ARNt) y ARN ribosómico (ARNr). El ARNt son pequeñas moléculas de ARN que pueden tener un aminoácido concreto en uno de sus extremos. Cuando una molécula de ARNm es leída para formar una proteína, un ARNt transporta su aminoácido hasta el lugar correcto de la cadena proteínica que se está formando. Esto tiene lugar en unas grandes estructuras del citoplasma de una célula llamadas ribosomas. El ARN ribosómico es uno de los principales componentes del ribosoma, donde actúa como una especie de andamio gigante que mantiene en su lugar a otras varias moléculas de ARN y proteínas. El mundo del ARN parecía, pues, bastante sencillo. Había un tipo de ARN estructural (el ARNt y el ARNr) y un tipo de ARN mensajero.

Durante décadas, las estrellas de la pasarela de la biología molecular eran el ADN (el código subyacente) y las proteínas (las dinámicas moléculas funcionales de la célula). El ARN estaba relegado a ser una molécula intermedia relativamente poco interesante que llevaba la información desde un plano hasta los trabajadores de la planta de producción.

Todos los que trabajan en el campo de la biología molecular aceptan que las proteínas son importantísimas. Desempeñan una enorme cantidad de funciones que hacen posible la vida. En consecuencia, los genes que codifican proteínas son también enormemente importantes. Cambios incluso muy pequeños en estos genes codificadores de proteínas pueden tener unos efectos devastadores, como las mutaciones que provocan la hemofilia o la fibrosis quística.

Pero esta manera de ver las cosas ha tenido unos efectos potencialmente un poco reductores en la comunidad científica. El hecho de que las proteínas, y por extensión los genes codificadores de proteínas, sean muy importantes, no implica que todos los demás elementos del genoma no lo sean también. Y sin embargo, este es el constructo teórico que se ha estado aplicando desde hace décadas y hasta hoy mismo. Esto es bastante raro, porque ya hace años que tenemos acceso a datos que ponen de manifiesto que con las proteínas no se acaba todo.

¿Por qué no nos desprendemos de nuestra basura?

Los científicos han descubierto hace ya tiempo que el guión de trabajo lo editan las células antes de entregarlo a los trabajadores de la planta. Esto se debe a los intrones, a quienes conocimos en el capítulo 3. Los intrones son las secuencias que se copian del ADN al ARNm, y que luego se ensamblan antes de que el mensaje sea traducido a una secuencia proteínica por los ribosomas. Los intrones fueron identificados por vez primera en 1975[2] y el premio Nobel por su descubrimiento se concedió a Richard Roberts y a Phillip Sharp en 1993.

Ya en la década de los setenta del siglo XX los científicos compararon organismos unicelulares con criaturas complejas como los humanos. La cantidad de ADN en sus células parecía sorprendentemente similar considerando lo distintos que eran los respectivos organismos. Esto sugirió que algunos genomas debían de contener un montón de ADN que no era realmente útil para nada, y ello llevó al concepto de "ADN basura"[3] –secuencias cromosómicas que no hacen nada útil porque no codifican proteínas. Más o menos por la misma época variosa laboratorios mostraron que grandes fragmentos del genoma de los mamíferos contenían secuencias de ADN que parecían repetirse una y otra vez y que no codificaban proteínas (ADN repetitivo). Dado que no codificaban proteínas se dio por supuesto que no hacían ninguna contribución al funcionamiento de las células. Parecían simplemente estar "viajando de gorra"[4, 5]. Francis Crick y otros acuñaron la expresión "ADN egoísta" para describir estas regiones. Estos dos modelos, el del ADN basura y el del ADN egoísta, han sido deliciosamente descritos recientemente como "el punto de vista emergente según el cual el genoma está en gran parte poblado por vagabundos genéticos y escombros dejados por la evolución"[6].

Nosotros los humanos somos unos seres extraordinarios, con nuestros billones de células, nuestros cientos de tipos de células, nuestra gran variedad de tejidos y órganos. Comparémonos (con cierta petulancia, tal vez) con un pariente lejano, un gusano microscópico, el nematodo Caenorhabditis elegans. *C. elegans*, como se le conoce habitualmente, tiene apenas un milímetro de longitud y vive en el suelo. Tiene muchos de los órganos que tienen los animales superiores, como un intestino, una boca, unas gónadas. Sin embargo, consta en total de unas mil células. Notablemente, a medida que se desarrolla *C. elegans*, los científicos han podido identificar exactamente cómo surge cada una de estas células.

Este diminuto gusano es una herramienta experimental muy poderosa porque nos proporciona un mapa de ruta del desarrollo de células y tejidos. Los científicos pueden alterar la expresión de un gen y luego trazar con gran precisión los efectos de dicho gen en el desarrollo normal. De hecho, *C. elegans* ha sentado los fundamentos de tantos avances en la biología del desarrollo que el año 2002 el Comité Nobel otorgó del Premio de Fisiología o Medicina a Sydney Brenner, Robert Horvitz y John Sulston por su trabajo con este organismo.

No queremos faltarle al respeto a *C. elegans* por cuestiones de utilidad, pero es evidente que es un organismo mucho menos complejo que nosotros. ¿Por qué somos nosotros mucho más sofisticados? Dada la importancia de las proteínas en la función celular, la suposición de partida era que los organismos complejos como los mamíferos tienen más genes codificadores de proteínas que las criaturas sencillas como *C. elegans*. Esta era una hipótesis perfectamente razonable, pero fue víctima de un fenómeno descrito por Thomas Henry Huxley. Huxley fue el paladín de Darwin en el siglo XIX y quien dijo que la gran tragedia de la ciencia era "el asesinato de una hipótesis hermosa por un hecho feo".

A medida que las tecnologías de secuenciación del ADN mejoraban en precio y en eficacia, muchos laboratorios en todo el mundo secuenciaron los genomas de varios organismos diferentes. Pudieron utilizar diversas herramientas informáticas para identificar los genes que probablemente codificaban proteínas en esos diferentes genomas. Lo que descubrieron fue realmente sorprendente. Había muchos menos genes codificadores de proteínas de lo que se esperaba. Antes de que el genoma humano fuese descodificado, los científicos habían predicho que habría más de 100.000 de tales genes. Actualmente sabemos que el número real está entre 20.000 y 25.000 genes[7]. Curiosamente, *C. elegans* contiene unos 20.200 genes[8],un número no muy alejado del nuestro.

No solo compartimos con *C. elegans* aproximadamente el mismo número de genes, sino que estos genes tienden a codificar más o menos las mismas proteínas. Esto significa que si analizamos la secuencia de un gen en las células humanas, podemos encontrar un gen de una secuencia similar en el nematodo. Así pues, las diferencias fenotípicas entre gusanos y humanos no las causa el hecho de que el Homo sapiens tenga unos genes diferentes o "mejores".

Sí es cierto que los organismos más complejos tienden a ensamblar sus genes de formas más diversas que las criaturas más simples. Utilizando una vez más como analogía el ejemplo del capítulo 3, *C. elegans* solo sería capaz de fabricar las proteínas DIG y DAN, mientras que los mamíferos podrían fabricar estas dos proteínas y también CARD, RIGA, CAIN y CARDIGAN.

Esto permitiría ciertamente a los humanos producir un repertorio mucho mayor de proteínas que ese gusano de apenas 1 mm, pero ello introduce un nuevo problema. ¿Cómo regulan los organismos más complejos sus patrones de ensamblaje? En teoría esta regulación podría ser controlada exclusivamente por las proteínas, pero también esto plantea dificultades. Cuantas más proteínas necesita regular una célula en una red compleja, más proteínas necesita para controlar la regulación. Modelos matemáticos han puesto de manifiesto que esto lleva rápidamente a una situación en la que el número de proteínas que necesitamos empieza a superar el número que realmente poseemos –lo que claramente no es sostenible.

¿Tenemos alternativa? Sí, la tenemos, y es la que se indica en la figura 10.1.

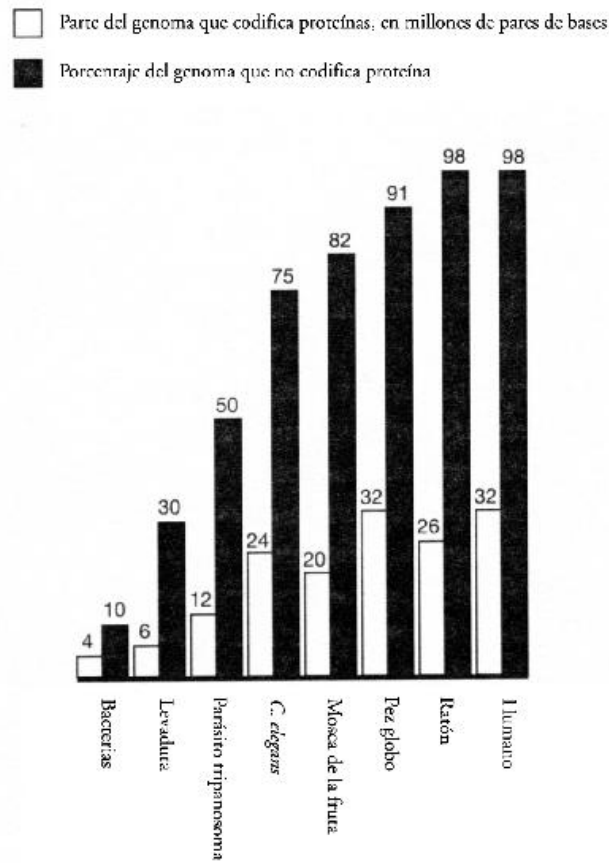

Figura 10.1: Este gráfico demuestra que la complejidad de los organismos vivos se corresponde mucho mejor con el porcentaje del genoma que no codifica proteínas (columnas negras) que con el número de pares de bases que codifican proteínas en un genoma (columnas blancas). Estos datos son una adaptación de los que se encuentran en Marrick, J. (2007), Exp Biol. 210: 1.526-1.547.

En un extremo tenemos a las bacterias. Las bacterias tienen unos genomas pequeños y muy compactos. Sus genes codificadores de proteínas cubren unos 4.000.000 de pares de bases, lo que es un 90 por ciento de su genoma. Las bacterias son organismos muy simples y bastante rígidos en la forma en que controlan la expresión de sus genes. Pero la cosa cambia a medida que ascendemos por el árbol evolutivo.

Los genes codificadores de proteínas de C. elegans cubren unos 24.000.000 de pares de bases, pero esto solo representa el 25 por ciento de su genoma. El restante 75 por ciento no codifica proteínas. Cuando llegamos a los humanos, las regiones codificadoras de proteínas cubren unos 32.000.000 de pares de bases, pero eso solo

representa un 2 por ciento del total del genoma. Son varias las formas en que podemos calcular las regiones codificadoras de proteínas, pero las diferencias son relativamente poco importantes para el asombroso balance final. Más del 98 por ciento del genoma humano no codifica proteínas. Solo un 2 por ciento de nuestro genoma no es ADN "basura".

Dicho de otro modo, ni el número de genes ni su tamaño se corresponde con la complejidad. El único rasgo de un genoma que realmente parece hacerse mayor a medida que los organismos se vuelven más complejos es la sección del mismo que no codifica proteínas.

La tiranía del lenguaje

Así pues, ¿qué es lo que hacen estas regiones del genoma y por qué son tan importantes? Es cuando empezamos a considerar esto cuando nos damos cuenta del enorme efecto que tienen el lenguaje y la terminología en los procesos mentales humanos. Estas regiones se llaman no codificantes, pero lo que realmente queremos decir es que no codifican *proteínas*. Y esto no es lo mismo que no codificar nada.

Hay un proverbio científico bien conocido: la ausencia de una prueba no es lo mismo que la prueba de una ausencia. Por ejemplo, en astronomía, una vez que los científicos hubieron desarrollado telescopios capaces de detectar radiación infrarroja, pudieron detectar miles de estrellas que nunca antes habían sido "vistas". Las estrellas habían estado siempre allí, pero no pudimos detectarlas de un modo concluyente hasta que dispusimos del instrumento adecuado para hacerlo. Un ejemplo más cotidiano sería el de la señal de un teléfono móvil. Estas señales están por todas partes a nuestro alrededor, pero no podemos detectarlas a menos que tengamos un teléfono móvil. Dicho de otro modo, lo que encontramos depende mucho de lo que estamos buscando.

Los científicos identifican los genes que se expresan en un tipo concreto de célula analizando las moléculas de ARN. Esto se hace extrayendo todo el ARN de las células y luego analizándolo utilizando varias técnicas diferentes para construir una base de datos de todas las moléculas de ARN presentes. Cuando, en los años ochenta del siglo XX, los científicos empezaron a investigar qué genes se expresaban en un tipo de célula determinado, las técnicas disponibles eran relativamente poco sensibles. Solo estaban diseñadas, además, para detectar moléculas de ARN, pues estas eran las únicas que se consideraban importantes. Estos métodos tendían a ser buenos

detectando los ARNm más expresados y bastante malos detectando las secuencias no tan bien expresadas. Otro factor que causaba confusión era que el software utilizado para analizar el ARNm estaba diseñado para ignorar las señales originalmente generadas por el ADN repetitivo, es decir, el ADN "basura".

Estas técnicas fueron de mucha utilidad para establecer el perfil del ARNm en el que ya estábamos interesados –las moléculas de ARNm que codificaban proteínas. Pero como hemos visto, esto solo representa aproximadamente un 2 por ciento del genoma. Solo cuando nuevas tecnologías de detección se combinaron con un fuerte aumento de la capacidad de procesamiento de los ordenadores empezamos a darnos cuenta de que estaba sucediendo algo muy interesante en el restante 98 por ciento –la parte no codificante de nuestro genoma.

Con estas metodologías mejoradas, el mundo científico empezó a darse cuenta de que había en realidad una enorme cantidad de transcripción en las partes del genoma que no codificaban proteínas. Inicialmente esto fue desestimado como "ruido transcripcional". Se sugirió que había un murmullo de expresión básico en todo el genoma, como si estas regiones del ADN produjesen ocasionalmente una molécula de ARN que superaba un determinado umbral de detección. La idea era que si bien podíamos detectar estas moléculas con nuestro nuevo equipo, mucho más sensible, en realidad no eran biológicamente importantes.

La expresión "ruido transcripcional" apunta a un fenómeno básicamente aleatorio. Sin embargo, los patrones de expresión de estos ARN que no codificaban proteínas eran diferentes en diferentes tipos de células, lo que sugería que su transcripción distaba mucho de ser aleatoria[9]. Por ejemplo, había mucha expresión de este tipo en el cerebro. Ahora sabemos que los patrones de expresión son diferentes en diferentes regiones del cerebro[10]. Este efecto es reproducible cuando se comparan las diversas regiones cerebrales de diferentes individuos. Esto no es lo que cabría esperar si esta transcripción de bajo nivel del ARN fuese un proceso puramente aleatorio.

Es cada vez más claro que esta transcripción de los genes que no codifican proteínas tiene en realidad una importancia fundamental para la función celular. Pero curiosamente seguimos atrapados en la trampa lingüística que nosotros mismos nos hemos tendido. El ARN producido en estas regiones, el ARN que previamente estaba bajo nuestro radar, se sigue llamando ARN no codificante (ARNnc). Es una expresión poco adecuada porque lo que en realidad queremos decir es ARN no codificador de proteínas. El ARNnc sí codifica algo, en realidad: se codifica a sí mismo, una molécula de ARN funcional. A diferencia del ARNm maduro, que es un ARN-medio para una proteína-fin, los ARNnc son un punto final en sí mismos.

Redefiniendo el significado del concepto "basura"

Este es el cambio de paradigma. Durante al menos 40 años, biólogos moleculares y genetistas se han centrado casi exclusivamente en los genes que codifican proteínas y en las propias proteínas. Ha habido excepciones, pero acabamos de tratarlas como trozos de materiales de construcción en el tejado de un cobertizo. Pero los ARN no codificantes están finalmente empezando a permanecer firmemente junto a las proteínas como moléculas plenamente funcionales. Diferentes pero iguales.

Estos ARNnc se encuentran por todo el genoma. Algunos provienen de los intrones. Originalmente se supuso que los fragmentos ensamblados de ARNm procedentes de los intrones eran degradados por las células. Actualmente parece mucho más probable que al menos algunos (si no la mayor parte o todos) son realmente procesados para actuar como ARNnc funcionales por derecho propio. Otros se solapan con los genes, transcritos frecuentemente como la hebra opuesta al ARNm codificante de una proteína. Y otros se encuentran en regiones en las que no hay genes codificadores de proteínas.

Hemos encontrado dos ARNnc en el último capítulo. Eran Xist y Tsix, los ARNnc necesarios para la desactivación X. Estos eran unos ARNnc muy largos, de varios miles de kilobases de longitud. Cuando Xist fue identificado por vez primera, era solo el segundo ARNnc conocido. Las estimaciones actuales sugieren que hay miles de moléculas de estas en las células de los mamíferos superiores, con más de 30.000 ARNnc "largos" (entendiendo por largos, de más de 3.200 bases) en los ratones[11]. Los ARNnc largos superan probablemente en número a los ARNm codificadores de proteínas.

Además de la desactivación X, los ARNnc largos también parecen jugar un papel fundamental en la impronta. Muchas regiones con impronta contienen una sección que codifica un ARNnc largo que silencia la expresión de los genes circundantes. Esto es parecido al efecto de Xist. Los ARNm codificadores de proteínas son silenciados en la copia del cromosoma que expresa el ARNnc largo. Por ejemplo, hay un ARNnc llamado Air, expresado en la placenta, exclusivamente procedente del cromosoma 11 de ratón heredado directamente del padre. La expresión del ARNnc Air reprime al gen cercano *Igf2r*, pero solo en el mismo cromosdoma[12]. Este mecanismo garantiza que *Igf2r* se expresa solamente en el cromosoma maternamente heredado.

El ARNnc Air dio a los científicos importantes atisbos sobre cómo estos ARNnc largos reprimen la expresión de los genes. El ARNnc

permaneció localizado en una región específica de un grupo de genes con impronta, y actuó como imán para una enzima epigenética llamada G9a. G9a pone una marca represiva en las proteínas de histona H3 en los nucleosomas depositados en esta región del ADN. Esta modificación de la histona crea un entorno represivo en la cromatina que desactiva a los genes.

Este descubrimiento fue particularmente importante por cuanto proporcionó un primer atisbo de respuesta a una pregunta que había desconcertado a los epigenetistas. ¿Cómo consiguen las enzimas que modifican las histonas, que ponen o quitan marcas epigenéticas, ser localizadas en regiones específicas del genoma? Las enzimas modificadoras de las histonas no reconocen directamente secuencias de ADN, ¿cómo acaban, pues, en la parte correcta del genoma?

Los patrones de modificación de las histonas están localizados en diferentes genes en diferentes tipos de células, lo que lleva a una expresión genética exquisitamente regulada. Por ejemplo, la enzima conocida como EZH2 metila al aminoácido llamado lisina en la posición 27 de la histona H3, pero se centra en diferentes moléculas de la histona H3 en diferentes tipos de células. Para decirlo de forma sencilla, puede metilar proteínas de la histona H3 posicionadas en el gen A de los leucocitos pero no en el de las neuronas. Es la misma enzima en ambas células, pero con una orientación diferente.

Hay cada vez más pruebas de que al menos parte de la orientación de las modificaciones epigenéticas pueden explicarse por las interacciones con los ARNnc largos. Jeannie Lee y sus colegas han investigado recientemente ARNnc largos que se ligan a un complejo de proteínas. El complejo se llama PRC2 y genera modificaciones represivas en las histonas. PRC2 contiene varias proteínas, y la que interactúa con el ARNnc largo es probablemente EZH2. Los investigadores encontraron que el complejo PRC2 se ligaba literalmente a miles de diferentes moléculas de ARNnc largo en células troncales embrionarias de ratón[13]. Estos ARNnc largos pueden actuar como un señuelo. Pueden permanecer ligados a la región específica del genoma en la que son producidos y luego atraer enzimas represivas que anulan la expresión de los genes. Esto sucede porque los complejos de enzimas represivas contienen proteínas como EZH2 que son capaces de ligarse al ARN.

A los científicos les encanta construir teorías y en torno a los ARNnc largos se estaba construyendo en cierto modo una teoría. Al parecer se ligan a la región desde la que son transcritos y reprimen la expresión de los genes en este mismo cromosoma. Pero si retomamos la analogía que hemos utilizado al principio de este capítulo, hemos de decir que cada vez está más claro que hemos construido un cobertizo muy pequeño y que ya hemos pegado con cemento unos cuantos materiales

de construcción en el tejado.

Hay una interesante familia de genes llamada genes HOX. Cuando estos genes son mutados en la mosca de la fruta o del vinagre (Drosophila melanogaster), el resultado son unos fenotipos increíbles, como unas patas que salen de la cabeza[14]. Hay un ARNnc largo conocido como HOTAIR, que regula una región de genes conocida como el grupo HOX-D. Igual que los ARNnc largos investighados por Jeannie Lee, HOTAIR se liga al complejo PRC2 y crea una región de la cromatina marcada con modificaciones represivas de las histonas. Pero HOTAIR no se transcribe desde la posición HOX-D en el cromosoma 12. Es codificado en un grupo diferente de genes llamado HOX-C en el cromosoma 2[15]. Nadie sabe cómo ni por qué HOTAIR se liga a la posición HOX-D.

Hay un misterio relacionado con este que afecta al mejor estudiado de todos los ARNnc largos, Xist. El ARNnc de Xist se extiende a lo largo de casi todo el cromosoma X interactivo, pero realmente no sabemos cómo lo hace. Normalmente los cromosomas no se ven colmados de moléculas de ARN. No hay motivos obvios de por qué el ARN de Xist puede ligarse de este modo, pero sabemos que no tiene nada que ver con la secuencia del cromosoma. Los experimentos descritos en el último capítulo, en los que Xist podía desactivar todo un autosoma siempre que contuviese un centro de desactivación X, pusieron de manifiesto que Xist simplemente sigue desplazándose una vez que está en un cromosoma. Los científicos siguen básicamente desconcertados por estas características fundamentales del mejor estudiado de todos los ARNnc.

Hay otra cosa sorprendente. Hasta hace muy poco, se pensaba que todos los ARNnc largos reprimían la expresión de los genes. El año 2010, el profesor Ramin Shiekhattar, del Wistar Institute de Filadelfia, identificó más de 3.000 ARNnc largos en diversos tipos de células humanas. Estos ARNnc largos manifestaban diferentes tipos de expresión en diferentes tipos de células humanas, lo que sugería que desempeñan unos roles muy concretos. El profesor Shiekhattar y sus colegas pusieron a prueba un pequeño número de ARNnc largos para tratar de determinar sus funciones. Utilizaron para ello unos métodos experimentales para desactivar la expresión de sus ARNnc de prueba y luego analizaron la expresión de los genes vecinos. Predijeron el resultado, y esta predicción y los resultados reales se muestran en la figura 10.2.

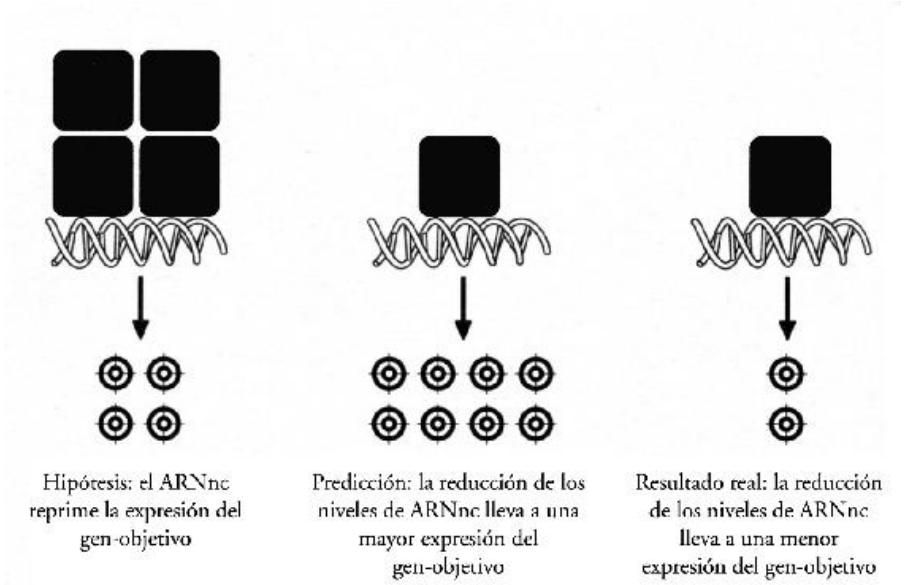

Figura 10.2: Se pensaba que los ARNnc reprimían la expresión de los genes-objetivo. Si esta hipótesis era correcta, reducir la expresión de un ARNnc específico tendría que resultar en una mayor expresión del gen objetivo a medida que disminuía la represión. Esto se muestra en la figura del centro. Sin embargo, es cada vez más claro que un gran número de ARNnc estimula en realidad la expresión de sus genes-objetivo. Esto se ha puesto de manifiesto en aquellos casos en los que reduciendo experimentalmente la expresión de un ARNnc ha tenido como resultado el efecto que se muestra en la figura de la derecha.

Se hizo la prueba con doce ARNnc y en siete casos los científicos encontraron el resultado que se muestra en la parte derecha de la figura 10.2. Esto fue lo contrario de lo esperado, porque sugería que aproximadamente un 50 por ciento de ARNnc largos podían en realidad estimular la expresión de los genes vecinos, no reducirla[16].

De un modo más bien conciso, los autores de la investigación concluyeron: "El mecanismo exacto por medio del cual nuestros ARNnc incrementan la expresión de los genes es desconocido." Es una afirmación muy difícil de refutar. Tiene el mérito de reconocer que actualmente no tenemos ni idea de lo que sucede. El trabajo de Ramin Shiekhattar demuestra de un modo bastante concluyente que es mucho todavía lo que no sabemos de los ARNnc largos, y que hemos de ser cautelosos y no precipitarnos a establecer nuevos dogmas.

Lo pequeño es hermoso

También hemos de ser cautelosos antes de concluir que el tamaño lo es todo y que lo grande es mejor. Los ARNnc largos claramente tienen

una gran importancia en la función celular, pero hay otra clase igualmente importante de ARNnc que también tiene un impacto significativo en las células. Los ARNnc de esta clase son cortos (tienen normalmente entre 20 y 24 bases de longitud) y tienen como objetivo las moléculas de ARN, no las de ADN. Esto se demostró por vez primera en nuestro gusano favorito, C. elegans.

Como ya hemos discutido, C. elegans es un sistema modelo muy útil porque sabemos exactamente cómo se desarrolla normalmente cada célula. La duración y la secuencia de las diferentes fases está estrechamente regulada. Uno de los reguladores clave es una proteína llamada LIN-14. El gen LIN-14 se expresa mucho (produce mucha proteína LIN-14) durante las primeras fases del embrión, pero su expresión se reduce a medida que los gusanos pasan de la fase larval 1 a la fase larval 2. Si el gen LIN-14 es mutado, el gusano confunde los ritmos de las diferentes fases. Si la proteína LIN-14 se queda demasiado tiempo, el gusano empieza a repetir las fases del desarrollo temprano. Si la proteína LIN-14 desaparece demasiado pronto el gusano pasa a fases larvales posteriores prematuramente. En cualquier caso, el gusano se hace un auténtico lío y las estructuras adultas normales no se desarrollan.

En 1993, dos laboratorios que trabajaban independientemente mostraron cómo se controlaba la expresión del gen LIN-14[17, 18]. Inesperadamente, el acontecimiento clave era la unión de un ARNnc pequeño a la molécula ARNm del gen LIN-14. Esto se muestra en la figura 10.3. Es un ejemplo de silenciamiento post-transcripcional en el que se produce un ARNm pero se evita que genere una proteína. Esta es una forma muy diferente de controlar la expresión de los genes respecto a la utilizada por los ARNnc largos.

La importancia de este trabajo fue sentar los fundamentos de un nuevo modelo de regulación de la expresión de los genes. Sabemos ahora que los ARNnc pequeños son un mecanismo utilizado por organismos del reino animal y vegetal para controlar la expresión de los genes. Hay varios tipos diferentes de ARNnc pequeños, pero vamos a concentrarnos principalmente en los microARN (miARN).

Al menos 1.000 diferentes miARN han sido identificados en las células de los mamíferos. Los miARN tienen unos 21 nucleótidos (bases) de longitud (a veces son algo más cortos o más largos) y la mayoría de ellos parecen actuar como reguladores post-transcripcionales de la expresión de los genes. No detienen la producción de un ARNm, sino que regulan el comportamiento del ARNm. Normalmente lo hacen uniéndose a la región no traducida 3' (RNT 3') de una molécula de ARNm. Esta región se muestra en la figura 10.3. Está presente en el ARNm maduro pero no codifica aminoácidos.

Cuando se copia el ADN genómico para hacer ARNm, el fragmento transcrito original tiende a ser muy largo porque contiene tanto exones (que codifican aminoácidos) como intrones (que no los codifican). Como vimos en el capítulo 3, los intrones son dejados de lado durante el proceso de ensamblaje para crear un ARNm que codifica una proteína. Pero la descripción del capítulo 3 omitió algo. Hay fragmentos de ARN al principio (conocidos como RNT 5') y al final (RNT 3') que no codifican aminoácidos y que tampoco son dejados de lado en el proceso como los intrones. Estas regiones no codificantes se retienen en el ARNm maduro y actúan como secuencias reguladoras. Una de las funciones de la RNT 3' en particular es ligar a las moléculas reguladoras, incluidos los miARN.

¿Cómo se liga un miARN a un ARNm y qué pasa cuando lo hace? El miARN y la RNT 3' del ARNm solo interactúan si se reconocen mutuamente. Para ello se sirven del emparejamiento de bases de modo similar al que se da en la replicación del ADN. La G se une con la C, y la A con la U (en el ARN, la U sustituye a la T del ADN). Aunque normalmente un miARN tiene 21 bases de longitud, no tienen que acoplarse al ARNm en los 21 nucleótidos. La región clave es la posición 2 a 8 del miARN.

A veces, la correspondencia de 2 a 8 no es perfecta, pero sí es lo bastante cercana como para que dos moléculas se apareen. En estos casos, el ensamblaje del miARN impide la traducción del ARNm a proteína (esto es lo que sucedía en el caso mostrado en la figura 10.3). Sin embargo, si la correspondencia es perfecta, la unión del miARN con el ARNm provoca la destrucción de este debido a las enzimas que acompañan al miARN[19]. Todavía no está claro si las posiciones 9 a 21 de los miARN también influyen de una forma menos directa en la orientación que toman estas pequeñas moléculas ni cuáles son las consecuencias. Lo que sí sabemos, sin embargo, es que un solo miARN puede regular más de una molécula de ARNm. Vimos en el capítulo 3 que un gen podía codificar muchas moléculas de proteínas diferentes alterando la forma en que se ensambla el ARN mensajero. Un solo miARN puede influir simultáneamente en muchas de estas versiones diferentemente ensambladas. Alternativamente, un solo miARN puede influir en unas proteínas poco relacionadas entre sí que son codificadas por genes diferentes pero que tienen secuencias similares de RNT 3'.

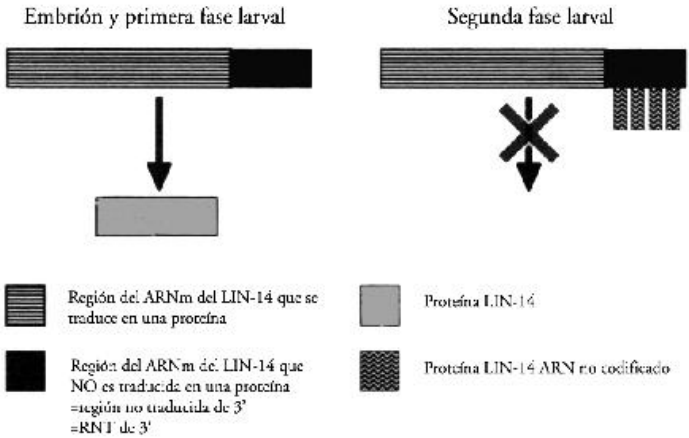

Figura 10.3: Dibujo esquemático para mostrar cómo la expresión de los microARN en fases concretas del desarrollo puede alterar radicalmente la expresión de un gen-objetivo.

Esto hace que sea muy difícil desentrañar qué hace exactamente un miARN en una célula, pues sus efectos varían en función del tipo de célula y de los demás genes (los que codifican proteínas y los que no) que la célula está expresando en un momento dado. Esto puede ser importante experimentalmente, pero también tiene consecuencias significativas en la salud y en la enfermedad. En las circunstancias en las que hay un número anormal de cromosomas, por ejemplo, no son solo los genes codificadores de proteínas los que varían en número. También habrá una producción anormal de ARNnc (grandes y pequeños). Dado que el miARN en particular puede regular a muchos genes, los efectos de alterar el número de copias de miARN pueden ser muy amplios.

Margen de maniobra

El hecho de que un 98 por ciento del genoma humano no codifique proteínas sugiere que ha habido una enorme inversión evolutiva en el desarrollo de complejos procesos reguladores mediados por el ARNnc. Algunos autores han llegado incluso a especular que los ARNnc son los rasgos genéticos que han sustentado el desarrollo de la característica más distintiva del *Homo sapiens*, sus procesos mentales superiores[20].

El chimpancé es nuestro pariente más cercano y su genoma fue publicado en el 2005[21]. No hay una cifra media sencilla y significativa que podamos dar para expresar lo semejantes que son los genomas del

hombre y del chimpancé. Las estadísticas son, en realidad, muy complicadas, porque hay que tener en cuenta que diferentes regiones genómicas (por ejemplo, secciones repetitivas versus regiones de genes codificadores de una sola copia codificadora de proteína) afectan a las estadísticas de modo diferente. Sin embargo, podemos afirmar claramente dos cosas. Una es que las proteínas humanas y las del chimpancé son increíblemente similares. Aproximadamente una tercera parte de todas las proteínas son exactamente las mismas entre nosotros y estos parientes nuestros que caminan apoyándose en los nudillos, y el resto solo difiere en uno o dos aminoácidos. Otra cosa que tenemos en común es que más del 98 por ciento de nuestro genoma no codifica proteínas. Esto sugiere que ambas especies utilizan ARNnc para crear complejas redes reguladoras que gobiernan la expresión de genes y proteínas. Pero hay una diferencia en concreto entre humanos y chimpancés que puede ser muy importante. Es la diferente forma en que es tratado el ARNnc en las células de las dos especies.

Todo tiene que ver con un proceso llamado “edición”. Según parece, las células humanas simplemente no pueden hacerlo todo por sí solas, particularmente por lo que respecta al ARNnc[22]. Una vez que se ha producido un ARNnc, las células humanas utilizan varios mecanismos para modificarlo aún más. En particular, a menudo cambian la base A por una llamada I (inosina). La base A puede acoplarse a la base T del ADN o a la base U del ARN. Pero la base I puede aparearse con A, C o G. Esto altera las secuencias a las que puede acoplarse y por tanto regular un ARNnc.

Nosotros los humanos, más que ninguna otra especie, editamos en un grado muy notable las moléculas de nuestro ARNnc. Ni siquiera otros primates efectúan esta reacción tan bien como nosotros[23]. También editamos de un modo particularmente amplio en el cerebro. Esto convierte a la edición del ARNnc en un proceso que es un buen candidato para explicar por qué somos mentalmente mucho más sofisticados que nuestros parientes primates, aunque compartimos con ellos una buena parte de la plantilla de ADN.

De algún modo, esta es la belleza de los ARNnc. Crean un método relativamente seguro que los organismos utilizan para alterar varios aspectos de la regulación celular. Probablemente la evolución ha favorecido este mecanismo porque es simplemente demasiado arriesgado tratar de mejorar la función cambiando proteínas. Las proteínas, como ven, son las Mary Poppins de la célula. Son “prácticamente perfectas en todos los sentidos”.

Todos los martillos se parecen. Los hay grandes y pequeños, pero en cuanto a diseño no es mucho lo que se puede cambiar para mejorar la función de un martillo. Lo mismo pasa con las proteínas. Las proteínas

de nuestros cuerpos han evolucionado durante miles de millones de años. Tomemos un solo ejemplo. La hemoglobina es el pigmento que transporta el oxígeno en nuestros cuerpos, en los glóbulos rojos. Está maravillosamente adaptada a recoger oxígeno en los pulmones y liberarlo en los tejidos donde es más necesario. En ningún laboratorio han podido crear una versión alterada de la hemoglobina que haga el trabajo mejor que la proteína natural.

Crear una molécula de hemoglobina que sea peor de lo normal es increíblemente fácil, desgraciadamente. De hecho, esto es lo que sucede en enfermedades como la anemia drepanocítica o falciforme, en las que las mutaciones crean unas proteínas de hemoglobina defectuosas Algo parecido pasa con las demás proteínas. Así, a menos que las condiciones ambientales cambien espectacularmente, la mayor parte de las alteraciones que sufre una proteína acaban siendo algo malo. La mayor parte de las proteínas son todo lo buenas que pueden ser.

Así pues, ¿cómo ha resuelto la evolución el problema de crear organismos cada vez más complejos y sofisticados? Básicamente, modificando la regulación de proteínas, en vez de modificar a las propias proteínas. Esto es lo que puede conseguirse utilizando redes complejas de ARNnc para influir en la forma, el momento y la medida en que se expresan determinadas proteínas –y hay pruebas de que esto es realmente lo que pasa.

Los miARN desempeñan papeles importantes en el control de la pluripotencia y en el control de la diferenciación celular. Las células ES pueden ser estimuladas a diferenciarse en otros tipos de células cambiando las condiciones del cultivo en el que crecen. Cuando empiezan a diferenciarse es esencial que las células ES desactiven los caminos de la expresión de los genes que normalmente les permiten seguir produciendo células ES adicionales (auto-renovación). Hay una familia de miARN llamada let-7, que es esencial para este proceso de desactivación[24].

Uno de los mecanismos que utiliza la familia let-7 es la regulación a la baja de una proteína llamada Lin28. Esto implica que Lin28 es una proteína pluripotencia. No tiene, por tanto, nada de sorprendente descubrir que Lin28 puede actuar como un factor Yamanaka. La sobre-expresión de la proteína Lin28 en las células somáticas incrementa la probabilidad de reprogramarlas a células iPS[25].

A la inversa, hay otras familias de miARN que ayudan a las células ES a permanecer pluripotente y auto-renovante. A diferencia de let-7, estos miARN promueven el estado pluripotente. En las células ES, los factores pluripotencia fundamentales, como Oct4 y Sox2, están unidos a los promotores de estos miARN, activando la expresión de los mismos. En cuanto las células ES empiezan a diferenciarse, estos

factores se desprenden de los miARN promotores y dejan de dirigir su expresión[26]. Igual que la proteína Lin28, estos miARN también mejoran la reprogramación de las células somáticas en células iPS[27].

Cuando comparamos células madre con su sus descendientes diferenciadas encontramos que expresan poblaciones muy diferentes de moléculas de miARN. Esto parece razonable, pues las células madre y las células diferenciadas expresan proteínas diferentes. Pero algunos ARNm pueden tardar mucho tiempo en descomponerse en una célula. Esto significa que cuando una célula madre empieza a diferenciarse, habrá un período en el que todavía contendrá muchos de los ARNm de la célula madre. Por fortuna, cuando la célula madre empieza a diferenciarse, activa a un nuevo conjunto de miARN. Estos se dirigen a los ARNm residuales de la célula madre y aceleran su destrucción. Esta rápida degradación de los ARNm preexistentes asegura que la célula se mueva hacia un estado indiferenciado lo más rápida e irreversiblemente posible[28].

Esta es una importante garantía de seguridad. No es bueno que las células retengan características inapropiadas de la célula madre –esto incrementa la probabilidad de que inicien el camino de un desarrollo cancerígeno. Este mecanismo se utiliza de un modo incluso más espectacular en especies en las que el desarrollo embrionario es muy rápido, como la mosca de la fruta o el pez cebra. En dichas especies este proceso garantiza que las secuencias transcritas de ARNm maternamente heredadas suministradas por el óvulo se degraden rápidamente a medida que este, una vez fertilizado, se convierte en un zigoto pluripotente[29].

Los miARN también son vitales para esa importante fase del control de la impronta, la formación de células germinales primordiales. Una fase clave en la creación de células germinales primordiales es la activación de la proteína Blimp 1 que encontramos en el capítulo 8. La expresión de Blimp 1 la controla una compleja interacción entre la actividad de Lin 28 y let-7[30]. Blimp 1 también regula una enzima que metila histonas y una clase de proteínas conocida como PIWI. Las proteínas PIWI, a su vez, se unen a otro tipo de pequeños ARNnc conocidos como ARN PIWI[31]. Los ARNnc y las proteínas PIWI no parecen desempeñar un papel importante en las células somáticas, pero son necesarios para la generación de la línea germinal masculina[32]. PIWI son las siglas de la expresión inglesa que corresponde a “testículos pequeños inducidos por el elemento P”. Si los ARNnc y las proteínas PIWI no interactúan adecuadamente, los testículos de los machos no se forman normalmente.

Estamos encontrando cada vez más cruces e interacciones entre los ARNnc y los fenómenos epigenéticos. Recuérdese que los intrusos epigenéticos, los retrotransposones, son normalmente metilados en la

línea germinal para impedir su activación. La senda PIWI está implicada en el objetivo de la metilación del ADN[33, 34]. Un número considerable de proteínas epigenéticas pueden interactuar con el ARN. La fijación de ARN no codificantes en el genoma puede ser el mecanismo general por medio del cual las modificaciones epigenéticas se dirigen a la región correcta de la cromatina en un tipo concreto de célula[35].

Los ARNnc se han visto recientemente implicados en la transmisión lamarckiana de los caracteres heredados. En un caso se implantaron óvulos de ratón fertilizados junto con un miARN orientado a un gen clave en el crecimiento del tejido coronario. Los ratones que se desarrollaron a partir de estos óvulos tenían el corazón más grande (hipertrofia cardíaca), lo que sugería que la temprana inyección del miARN había alterado los procesos normales del desarrollo. Notablemente, las crías de estos ratones también tenían una frecuencia elevada de hipertrofia cardíaca. Esto se debía aparentemente a que la expresión anormal del miARN era recreada durante la producción de esperma en estos ratones. No había cambios en el código del ADN de los ratones; estaba claro, por lo tanto, que se trataba de un caso de herencia epigenética causada por el miARN[36].

La ley de Murphy (si algo puede salir mal, suele salir mal)

Pero si los ARNnc son tan importantes para la función celular, seguramente podríamos esperar encontrar que algunas enfermedades estuvieran causadas por problemas en ellos. ¿No deberíamos encontrar muchos ejemplos de defectos en los que la producción o la expresión de los ARNnc originasen trastornos clínicos, aparte de la impronta o de las condiciones de la desactivación X? Bueno, sí y no. Dado que estos ARNnc son predominantemente moléculas reguladoras que actúan en redes llenas de mecanismos compensatorios, los defectos solo pueden tener un impacto relativamente leve. El problema que esto crea experimentalmente es que la mayoría de cribas genéticas son útiles para detectar los principales fenotipos causados por mutaciones en las proteínas, pero pueden no ser tan útiles para detectar efectos más leves.

Hay un ARNnc pequeño llamado BC1 que se expresa en unas determinadas neuronas de ratón. Cuando los investigadores de la Universidad de Munster en Alemania borraron estos ARNnc, los ratones parecían estar bien. Pero luego los científicos trasladaron a los animales mutantes desde el ambiente controlado del laboratorio a un

entorno más natural. En estas condiciones se hizo evidente que los mutantes no eran iguales que los ratones normales. Eran reacios a explorar sus alrededores y se mostraban ansiosos[37]. Si simplemente los hubiesen dejado tranquilos en sus jaulas, nunca habríamos advertido que la pérdida del ARNnc BC1 tenía realmente un efecto pronunciado en su comportamiento. Un caso claro de que lo que vemos depende de cómo miramos.

El impacto de los ARNnc en condiciones clínicas está empezando a hacerse evidente, al menos en unos cuantos casos. Hay una raza de ovejas llamada Texel de la que la descripción más respetuosa que se me ocurre es decir que son rollizas. Las Texel son conocidas por tener mucho músculo, lo cual no es nada malo para un animal cuya carne está destinada al consumo. Se ha demostrado que la muscularidad de esta raza de ovejas se debe al menos parcialmente a un cambio en un miARN en la RNT 3' de un gen específico. La proteína codificada por este gen se denomina miostatina y normalmente reduce el crecimiento muscular[38]. El impacto de un solo cambio de base se resume en la figura 10.4. El tamaño final de la oveja Texel se ha exagerado para mayor claridad.

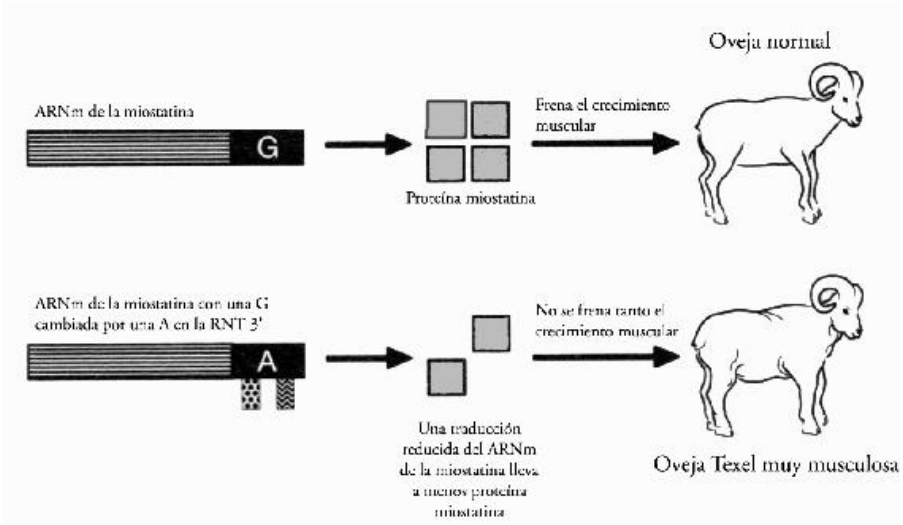

Figura 10.4: Un cambio en una sola base que está en una parte del gen de la miostatina y que no codifica ninguna proteína tiene, sin embargo, un fuerte impacto en la raza de ovejas Texel. La presencia de una base A en vez de una G en el ARNm de la miostatina lleva a la unión de dos miARN concretos. Esto altera la expresión de la miostatina, que tiene como resultado unas ovejas con un crecimiento muscular muy pronunciado.

El síndrome de Tourette es un trastorno del neurodesarrollo en el que el paciente sufre frecuentemente movimientos convulsivos involuntarios (tics) que en algunos casos están asociados con el uso involuntario de palabrotas. Se comprobó que dos individuos no relacionados que sufrían este mismo trastorno tenían el mismo cambio de una sola base en la RNT 3' de un gen llamado *SLITRK1*[39]. *SLITRK1* es necesario al parecer para el desarrollo neuronal. El cambio de base en los pacientes del síndrome de Tourette deja libre un lugar para un ARNnc corto llamado miR-189. Esto sugiere que la expresión de *SLITRK1* puede verse anormalmente reducida a través de este lugar en momentos críticos del desarrollo. Esta alteración solo está presente en algunos casos del síndrome de Tourette, pero plantea la tentadora sugerencia de que la mala regulación de la región de encaje de los miARN en otros genes neuronales puede verse involucrada en otros pacientes.

Antes, en este mismo capítulo, hemos encontrado la teoría de que los ARNnc pueden haber sido vitalmente importantes en el desarrollo de una gran complejidad y sofisticación cerebral en los humanos. Si este es el caso, podríamos predecir que el cerebro sería particularmente susceptible a los defectos en la actividad y en la función del ARNnc. En realidad, los casos de síndrome de Tourette que hemos visto en el párrafo anterior nos dejan entrever este escenario.

Hay una enfermedad en los humanos llamada síndrome de DiGeorge

en la que una región de unas 300.000 bases se ha perdido de una de las dos copias del cromosoma 22[40]. Esta región contiene más de 25 genes. No tiene nada de sorprendente que diversos sistemas puedan verse afectados en los pacientes que sufren esta alteración, incluidos el sistema genito-urinario, el cardiovascular y el esquelético. El 40 por ciento de los pacientes del DiGeorge sufren ataques y un 25 por ciento de los adultos con esta enfermedad desarrollan esquizofrenia. Un retraso mental leve o moderado también es común en ellos. Diferentes genes de la región de 300.000 pares de bases contribuyen probablemente a diferentes aspectos de la enfermedad. Uno de los genes se llama DGCR8, y la proteína DGCR8 es esencial para la producción normal de miARN. Se han creado ratones genéticamente modificados con solo una copia funcional de Dgcr8. Estos ratones desarrollan problemas cognitivos, especialmente en el aprendizaje y en el procesamiento espacial[41].Esto respalda la idea de que la producción de miARN puede ser importante en la función neurológica.

Sabemos que los ARNnc son importantes en el control de la pluripotencia y la deformación celular. Desde ahí no es un gran salto formular la hipótesis de que los miARN pueden ser importantes en el cáncer. El cáncer es clásicamente una enfermedad en la que las células pueden proliferar. Esto tiene paralelos con las células madre. En el cáncer, además, los tumores a menudo tienen un aspecto relativamente indiferenciado y desorganizado bajo el microscopio. Esto contrasta con la apariencia completamente desarrollada y bien organizada de un tejido sano normal. Existen actualmente bastantes pruebas de que los ARNnc desempeñan un papel en el cáncer. Este papel puede implicar o bien la pérdida de unos miARN concretos o la sobre-expresión de otros miARN, como se muestra en la figura 10.5.

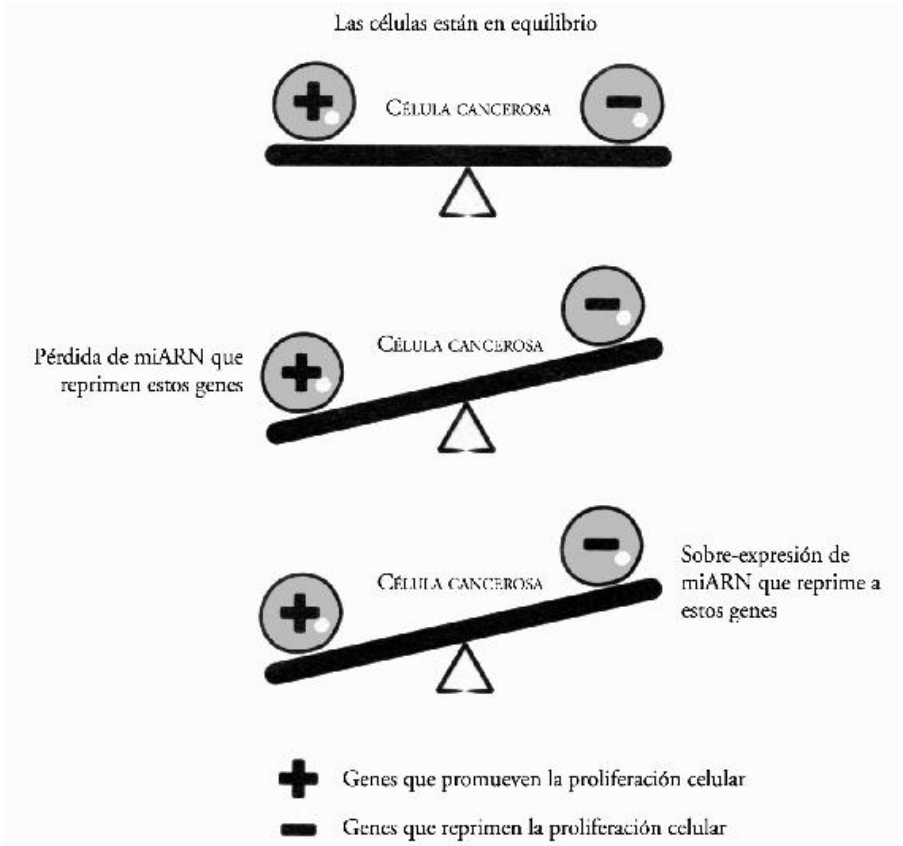

Figura 10.5: Unos niveles reducidos de determinados tipos de miARN, o unos niveles elevados de otros tipos pueden tener en última instancia el mismo efecto perturbador en la expresión de los genes. El resultado final puede ser un aumento en la expresión de genes que llevan a las células a un estado altamente proliferativo, lo que aumenta la probabilidad de que se desarrolle un cáncer.

La leucemia linfocítica crónica es la leucemia humana más común. Aproximadamente el 70 por ciento de casos de este tipo de cáncer[42] han perdido los ARNnc llamados miR-15a[a] y miR-16-1. El cáncer es una enfermedad de varios pasos y muchas cosas tienen que torcerse en una célula individual antes de que esta se vuelva cancerosa. El hecho de que tantos casos de este tipo de leucemia, la forma más común de leucemia en los humanos, careciera de estos miARN en particular sugería que la pérdida de estas secuencias se produce en una fase temprana del desarrollo de la enfermedad.

Un ejemplo del mecanismo alternativo –la sobre-expresión de los miARN en el cáncer– es el caso del grupo miR-17-92. Este grupo se sobre-expresa en una serie de cánceres[43].De hecho, se han publicado muchos trabajos sobre la expresión anormal de los miARN en el cáncer[44]. Además, un gen llamado TARBP2 es mutado en unas condiciones cancerígenas heredadas[45].La proteína TARBP2 está

implicada en el procesamiento normal de los miARN. Esto refuerza la idea de que los miARN tienen un papel en la iniciación y el desarrollo de determinados cánceres humanos.

¿Esperanza o despliegue publicitario?

Dadas las cantidades cada vez mayores de datos que sugieren un papel importante de los miARN en el cáncer, no tiene nada de extraño que los científicos estén empezando a mostrarse cada vez más interesados en la posibilidad de utilizar estas moléculas para el tratamiento del cáncer. La idea sería sustituir los miARN "ausentes" o inhibir a los que se sobre-expresan. La esperanza era que esto podría conseguirse recetando a los pacientes de cáncer miARN o variantes artificiales de ellos. Esto también podría tener aplicaciones en otras enfermedades en las que la expresión de los miARN puede haberse vuelto anómala.

Grandes compañías farmacéuticas están ciertamente investigando copiosamente en este campo. Tanto Sanofi-Aventis como GlaxoSmithKline han iniciado proyectos de colaboración de muchos millones de dólares con una empresa de San Diego llamada Regulus Therapeutics. Están investigando el desarrollo de inhibidores o sustitutos de los miARN para utilizarlos en el tratamiento de enfermedades que van desde el cáncer hasta las enfermedades autoinmunes.

Hay unas moléculas muy parecidas a los miARN llamadas siARN ("small interfering" o moléculas pequeñas interferentes) que utilizan los mismos procesos que los miARN para reprimir la expresión de los genes, especialmente la degradación de los ARNm. Los siARN se han utilizado mucho en investigación porque pueden administrarse a células en cultivo para desactivar genes con fines experimentales. El año 2006 se concedió el premio Nobel de Fisiología o Medicina a Andrew Fire y Craig Mello, los científicos que desarrollaron por vez primera esta tecnología.

Las compañías farmacéuticas se mostraron muy interesadas en utilizar los siARN como nuevos fármacos potenciales. Teóricamente, las moléculas de siARN podían utilizarse para desactivar la expresión de cualquier proteína que se considerase que podía tener efectos perjudiciales en una enfermedad. El mismo año en que se concedió el premio Nobel a Fire y Mello, la compañía farmacéutica Merck invirtió más de mil millones de dólares en una compañía californiana especializada en siARN llamada Sirna Therapeutics. Otras grandes compañías farmacéuticas también invirtieron en este campo.

Pero el año 2010 una brisa gélida empezó a recorrer la industria farmacéuitica. Roche, la gigantesca farmacéutica suiza, anunció que interrumpía sus programas siARN, pese a haber invertido más de 500 millones de dólares en ellos en los tres años anteriores. Su vecina compañía suiza Novartis también interrumpió su colaboración con otra compañía siARN de Massachusetts llamada Alnylam. Hay todavía algunas compañías que siguen invirtiendo en este campo, pero probablemente es justo decir que actualmente hay un cierto nerviosismo en torno a esta tecnología.

Uno de los mayores problemas que implica el uso de este tipo de enfoque es que terapéuticamente puede parecer muy prosaico. Los ácidos nucleicos, como el ADN y el ARN, son difíciles de convertir en buenos fármacos. La mayor parte de los fármacos existentes –Ibuprofeno, Viagra, antihistamínicos– tienen determinadas características en común. Uno se los traga, atraviesan las paredes del intestino, se propagan por todo el cuerpo, no son destruidos demasiado pronto por el hígado, son absorbidos por las células y producen sus efectos en las moléculas que hay en las células. Todo esto parece muy sencillo, pero son las cosas más difíciles de conseguir a la hora de desarrollar un nuevo fármaco. Las compañías invierten decenas de millones de dólares –como mínimo– para hacer bien esta parte del proceso, pero este sigue siendo en buena medida un proceso sorprendentemente aleatorio.

Es mucho más difícil cuando se trata de crear fármacos relacionados con los ácidos nucleicos. Esto se debe en parte a su tamaño. Una molécula de siARN es más de 50 veces mayor que un fármaco como el Ibuprofeno. Cuando se crea un fármaco (especialmente los de consumo oral, no tanto los destinados a ser inyectados) la norma general es que cuanto más pequeño mejor. Cuanto mayor es un fármaco, más difícil es lograr introducir grandes dosis del mismo en el cuerpo del paciente y hacer que se mantengan en él el tiempo suficiente. Este puede ser el motivo de que una compañía como Roche haya decidido que puede gastar más eficazmente su dinero en otros proyectos. Esto no significa que los siARN no vayan a utilizarse nunca para tratar enfermedades, solo que es una empresa económicamente arriesgada. Los miARN tienen que hacer frente esencialmente a los mismos problemas, porque los ácidos nucleicos son muy similares en ambos enfoques.

Afortunadamente, hay varias maneras de enfocar un mismo problema, y en el próximo capítulo veremos que ya hay fármacos orientados a enzimas epigenéticas que se utilizan para tratar pacientes con cánceres severos.

1. De Scientific Autobiography and Other Papers (1950).
2. Mulder et al. (1975), Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 39:

397-400.
3. Ohno (1972), Brookhaven Symposia in Biology 23: 366-370.
4. Véase Orgel y Crick (1980), Nature 284: 604-607.
5. Véase Doolittle y Sapienza (1980), Nature 284: 601-603.
6. Mattick (2009), Annals N Y Acad Sci. 1.178: 29-46.
7. http://genome.wellcome.ac.uk/node30006.html.
8. http://wiki.wormbase.org/index.php/WS205
9. Para una reseña útil véase Qureshi et al. (2010), Brain Research 1.338: 20-35.
10. Clark and Mattick (2011), Seminars in Cell and Developmental Biology, en prensa.
11. Carninci et al. (2005), *Science* 309: 1.559-1.563.
12. Nagano et al. (2008), *Science* 322: 1.717-1.720.
13. Zhao et al. (2010), Molecular Cell 40: 939-953.
14. Garber et al. (1983), EMBO J. 2: 2.027-36.
15. Rinn et al. (2007), Cell 129: 1.311-1.323.
16. Ørom et al. (2010), Cell 143: 46-58.
17. Lee et al. (1993), Cell 75: 843-854.
18. Wightman et al. (1993), Cell 75: 858-62.
19. Para una buena reseña, véase Bartel (2009), Cell 136: 215-233.
20. Mattick, J.S. (2010), BioEssays 32: 548-552.
21. Chimpanze Sequencing and Analysis Consortium (2005), Nature 437: 69-87.
22. Athanasiasdis et al. (2004), PLoS Biol. 2: e391.
23. Paz-Yaacov et al. (2010), Proc Natl Acad Sci. USA 107: 12174-9.
24. Melton et al. (2010), Nature 463: 621-628.
25. Yu et al. (2007), Science 318: 1.917-20.
26. Marson et al. (2008), Cell 134: 521-33.
27. Judson et al. (2009), Nature Biotechnology 27: 459-461.
28. Reseñado en Pauli et al. (2011), Nature Reviews Genetics 12: 136-149.
29. Giraldez et al. (2006), Science 312: 75-79.
30. West et al. (2009), Nature 460: 909-913.
31. Vagin et al. (2009), Genes Dev. 23: 1.749-62.
32. Deng y Lin (2002), Developmental Cell 2: 819-830.
33. Aravin et al. (2008), Molecular Cell 31: 785-799.
34. Kuramochi-Miyagawa et al. (2008), Genes and Development 22: 908-917.
35. Reseñado en Mattick et al. (2009), BioEssays 31: 51-59.
36. Wagner et al. (2008), Dev. Cell. 14_ 962-9.
37. Lewejohann et al. (2004), Behav Breain Res. 154: 273-89.
38. Clop et al. (2006), Nature Genetics 38: 813-818.
39. Abelson et al. (2005), Science 310: 317-320.
40. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/188400.

41. Strak et al. (2008), Nature Genetics 40: 751-760.
42. Calin et al. (2004), Proc Nat Acad Sci. USA 101: 2.999-3.004.
43. Volinia et al. (2006), Proc Nat Acad Sci. USA 103: 2.257-2.261.
44. Para una reseña útil, véase Garzón et al. (2010), Nature Review Drug Discovery 9: 775-789.
45. Melo et al. (2009), Nature Genetics 41: 365-370.

Capítulo 11
Luchando contra el enemigo interior

La frase más excitante que puede oírse en el campo científico,
la que presagia nuevos descubrimientos,
no es "¡Eureka!", sino "¡Es curioso…"
Isaac Asimov

En la ciencia hay muchos ejemplos de un acontecimiento relativamente aleatorio que lleva a un gran avance. Probablemente el ejemplo más famoso de ello es la observación que hizo Alexander Fleming de que un moho en particular, que había ido a parar por casualidad a una placa de Petri experimental, podía matar a las bacterias que crecían allí. Fue este acontecimiento casual el que llevó al descubrimiento de la penicilina y al desarrollo de todo el campo de los antibióticos. Se han salvado millones de vidas gracias a este descubrimiento aparentemente casual.

Alexander Fleming ganó el premio Nobel de Fisiología o Medicina en 1945, junto con Ernst Chain y Howard Florey, que averiguaron cómo producir penicilina en grandes cantidades para utilizarla para tratar pacientes. La famosa cita de Isaac Asimov que abre este capítulo nos dice que Alexander Fleming no fue simplemente un hombre de suerte. Su intuición no fue pura chiripa. Es muy poco probable que Fleming fuese el primer científico cuyos cultivos bacterianos se viesen infectados por un moho. Su logro estuvo en darse cuenta de que había sucedido algo insólito y en comprender su importancia. Los conocimientos y la experiencia de Fleming le habían preparado para que su mente sacase el máximo partido a aquel acontecimiento casual. Vio lo que probablemente otros muchos habían visto antes que él, pero pensó lo que nadie había pensado.

Incluso aceptando el curioso papel que desempeña el azar en la investigación, sería demasiado reconfortante pensar que la ciencia procede generalmente de una forma lógica y coherente. Esta es una de las formas en que podemos imaginar el progreso de la epigenética.…

Las modificaciones epigenéticas controlan el destino de las células – es gracias a estos procesos que las células hepáticas, por ejemplo, siguen siendo células hepáticas y no se convierten en otros tipos de células. El cáncer representa una ruptura en el control normal del destino de las células, porque las células hepáticas dejan de ser células

hepáticas y se convierten en células cancerosas, lo que da a entender que la regulación epigenética se ha vuelto anormal en el cáncer. Por consiguiente, hemos de tratar de desarrollar fármacos que puedan revertir esta mala regulación epigenética. Dichos fármacos serían útiles para tratar o controlar el cáncer.

Visto así, el proceso es pulcro y ordenado, y parece lógico. De hecho, la industria farmacéutica está invirtiendo cientos de millones de dólares para desarrollar drogas epigenéticas exactamente con este propósito. Pero el proceso mental que llevó a descubrir fármacos para combatir el cáncer no empezó de este modo.

Existen fármacos autorizados para tratar el cáncer que funcionan inhibiendo enzimas epigenéticas. Se demostró que algunas de estas sustancias eran eficaces en el tratamiento del cáncer antes de saberse que actuaban sobre las enzimas epigenéticas. De hecho, fue el éxito de estas sustancias lo que despertó el interés en las terapias epigenéticas y en el campo de la epigenética en general.

El epigenetista accidental

A comienzos de la década de 1970, un joven científico sudafricano llamado Peter Jones estaba trabajando con un compuesto químico llamado 5-azacitidina. Se sabía que este compuesto tenía efectos anticancerígenos porque podía detener la división celular en la leucemia, y había tenido efectos beneficiosos en pruebas con pacientes infantiles con leucemia[1].

Peter Jones es considerado actualmente el fundador de los tratamientos epigenéticos del cáncer. Jones es un hombre alto, delgado, de tez bronceada y con el pelo blanco muy corto, cuya presencia se hace notar inmediatamente en cualquier conferencia. Como muchos de los grandes científicos mencionados en este libro, lleva décadas investigando en un campo en constante evolución y sigue estando a la vanguardia de los esfuerzos para entender el impacto de la epigenética en la salud. Actualmente encabeza el esfuerzo por caracterizar todas las modificaciones epigenéticas presentes en un gran número de diferentes tipos de células y enfermedades. Jones y sus colaboradores pueden hoy utilizar tecnologías que permiten analizar millones de datos obtenidos gracias al uso de un equipo altamente especializado. Ya en la década de 1970 hizo sus primeros avances a base de ser increíblemente observador y meticuloso –un caso clásico de mente bien equipada.

Cuarenta años atrás, nadie estaba muy seguro de cómo actuaba la 5-azacitidina. La estructura de esta sustancia es muy similar a la de la

base C (citidina) del ADN y el ARN. Se suponía que la 5-azacitidina se introducía en las cadenas de ADN y ARN, y que una vez allí perturbaba de algún modo el proceso normal de copia del ADN y la transcripción o la actividad del ARN. Las células cancerígenas como las que se encuentran en la leucemia son extraordinariamente activas. Necesitan sintetizar montones de proteínas, lo que significa que necesitan transcribir mucho ARN. Debido a que se dividen rápidamente también tienen que replicar su ADN de un modo muy eficiente. Si la 5-azacitidina interfería en alguno de estos dos procesos, o en ambos, probablemente obstaculizaría el crecimiento y la división de las células cancerígenas.

Peter Jones y sus colegas estaban poniendo a prueba los efectos de la 5-azacitidina en una serie de células de mamífero. Es sumamente complicado cultivar muchos tipos de células en el laboratorio si uno se limita a tomarlas directamente de un humano o de un animal. Aunque es posible hacerlas crecer, a menudo dejan de dividirse al cabo de unas cuantas divisiones, y mueren. Para evitarlo, Peter Jones trabajó con líneas celulares. Las líneas celulares derivan originalmente de tejidos animales, incluidos humanos, pero debido a manipulaciones casuales o experimentales pueden crecer indefinidamente en el laboratorio si disponen de los nutrientes, la temperatura y otras condiciones ambientales adecuadas. Las líneas celulares no son exactamente lo mismo que las células corporales, pero constituyen un útil sistema experimental.

El tipo de células con las que Peter Jones y sus colegas estaban experimentando se cultivan normalmente en unos recipientes de plástico planos, muy parecidos a una especie de petaca transparente de whisky o brandy puesta de lado. Las células de mamífero crecen en la superficie interior plana del recipiente formando una sola capa de células estrechamente empaquetadas lateralmente, pero nunca una encima de otra.

Una mañana, después de que las células hubiesen sido tratadas con 5-azacitidina durante varias semanas, los investigadores advirtieron que se había formado un extraño bulto en uno de los recipientes. A simple vista, parecía una infección por moho. La mayoría de científicos simplemente habrían descartado el recipiente prometiendo ser un poco más cuidadosos con sus cultivos de células para que no volviera a suceder nada parecido. Pero Peter Jones hizo algo más. Examinó el bulto minuciosamente y descubrió que no se trataba en absoluto de un montón de moho. Era una gran masa de células que se habían fusionado hasta formar unas células gigantes que contenían muchos núcleos. Eran pequeñas fibras musculares, el tipo de tejido sincitial que hemos visto al discutir la desactivación X. En ocasiones, aquellas pequeñas fibras musculares incluso se movían[2].

Aquello era realmente muy extraño. Aunque la línea celular derivaba originalmente de un embrión de ratón, normalmente nunca había formado nada parecido a una célula muscular. Había tendido en cambio a formar células epiteliales –el tipo de célula que reviste a la superficie de la mayoría de nuestros órganos. El trabajo de Peter Jones puso de manifiesto que la 5-azacitidina podía cambiar el potencial de aquellas células embrionarias y obligarlas a convertirse en células musculares en vez de células epiteliales. Pero ¿por qué un compuesto que mataba células cancerígenas, presumiblemente perturbando la producción de ADN y ARNm, iba a tener un efecto parecido?

Peter Jones siguió trabajando en ello cuando se trasladó desde Sudáfrica a la Universidad de California. Dos años más tarde, él y su estudiante de doctorado Shirley Taylor, mostraron que las líneas celulares tratadas con 5-azacitidina no solo formaban células musculares. También podían formar otro tipo de células, como células de grasa (adipocitos) y unas células llamadas condrocitos. Los condrocitos producen las proteínas cartilaginosas como las que revisten las superficies de las articulaciones para que un plano pueda deslizarse suavemente sobre el otro.

Estos datos pusieron de manifiesto que la 5-azacitidina no era un factor especial especificador de tejido muscular. De un modo muy clarividente, el profesor Jones, en el artículo en el que resumía su trabajo de investigación, sugirió que "la 5-azacitidina… causa una reversión a un estado más pluripotente"[3]. Dicho de otro modo, esa sustancia empujaba a la bola haciéndola retroceder un poco por el paisaje epigenético de Waddington. Luego la bola volvía a bajar por los valles del paisaje hasta llegar al pie de una colina diferente.

Pero no existía todavía ninguna teoría que diese cuenta de por qué la 5-azacitidina producía este extraño efecto. El propio Peter Jones cuenta una divertida historia de autodesaprobación acerca del momento en que se produjo un punto de inflexión en su comprensión del problema. Inicialmente, su nombramiento en la Universidad de California del Sur era en el Departamento de Pediatría, pero él quería también hacerlo compatible con su ingreso en el Departamento de Bioquímica. Parte del procedimiento para obtener este doble nombramiento incluía una entrevista adicional que él consideraba básicamente innecesaria. En aquella entrevista Peter Jones describió su investigación con la 5-azacitidina y explicó que nadie sabía por qué aquella sustancia influía en la pluripotencia celular. Fue entonces cuando Robert Stellwagen, otro científico de la misma universidad que participaba en la entrevista, preguntó: "¿Habéis pensado en la metilación del ADN?." El candidato reconoció que no solo no había pensado en la metilación del ADN sino que nunca había oído hablar de ello[4].

Peter Jones y Shirley Taylor se centraron inmediatamente en la metilación del ADN y en muy poco tiempo demostraron que este era efectivamente un proceso clave para explicar los efectos que produce la 5-azacitidina. Habían descubierto que la 5-azacitidina inhibe la metilación del ADN. Peter Jones y Shirley Taylor crearon una serie de compuestos parecidos e investigaron qué efectos tenían en un cultivo celular. Los que inhibían la metilación del ADN también causaban los cambios fenotípicos observados inicialmente en el caso de la 5-azacitidina. Los compuestos que no inhibían la metilación del ADN no tenían ningún efecto fenotípico[5].

El callejón sin salida de la metilación

La citidina y la 5-azacitidina tienen una estructura química muy parecida. Se muestran en la figura 11.1, que por simplicidadpara mayor claridad solo muestra las partes más relevantes de la estructura (llamadas citosina y 5-azacitosina, respectivamente).

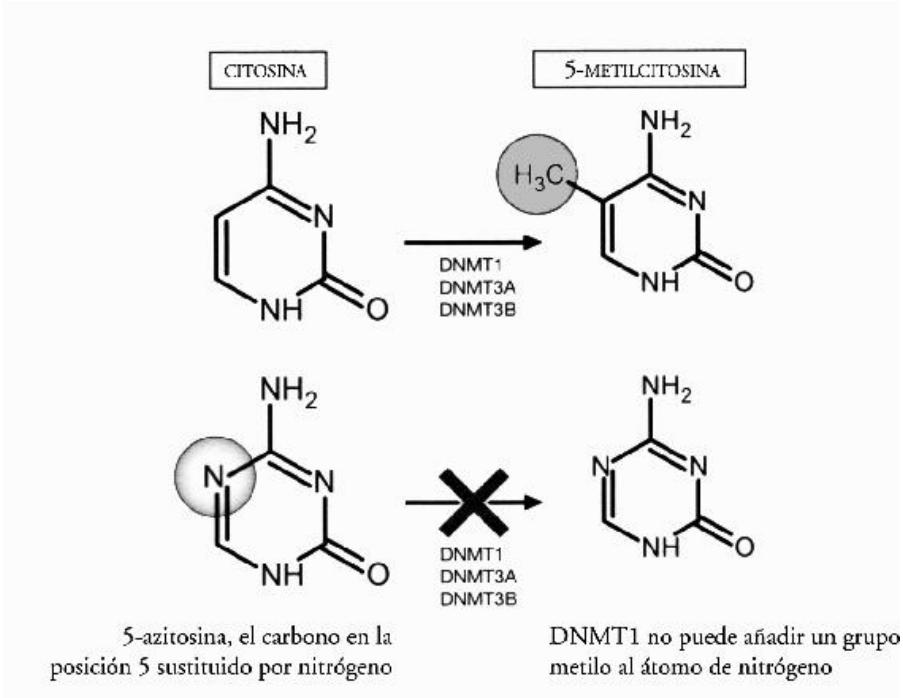

Figura 11.1: La 5-azacitosina puede ser incorporada en el ADN durante la replicación de este que tiene lugar antes de la división celular. La 5-azacitosina ocupa el lugar de una base C, pero dado que contiene un átomo de nitrógeno donde normalmente hay un átomo de carbono, la base externa no puede ser metilada por DNMT1 de la forma que se describe en la figura 4.2.

La mitad superior del diagrama es similar a la de la figura 4.1, y muestra que la citosina puede ser metilada por una ADN-metiltransferasa (DNMT1, DNMT3A o DNMT3B) para crear 5-metilcitosina. En 5-azacitosina, un átomo de nitrógeno (N) sustituye al átomo clave de carbono (C), que normalmente es metilado. Las ADN-metiltransferasas no pueden añadir un grupo metilo a este átomo de nitrógeno.

Recordando lo que decíamos en el capítulo 4, imaginemos una región metilada del ADN. Cuando una célula se divide, separa las dos hebras de la doble hélice del ADN y las copia. Pero las enzimas que copian el ADN no pueden copiar la metilación del ADN. En consecuencia, cada nueva doble hélice tenía una hebra metilada y una hebra no metilada. La ADN-metiltransferasa llamada DNMT1 puede reconocer al ADN que ha sido metilado solamente en una hebra, y puede reemplazarla en la otra hebra. De este modo se restablece el patrón original de metilación del ADN.

Pero si las células que se dividen son tratadas con 5-azacitidina, esta base citidina anómala se añade a la nueva hebra de ADN cuando el genoma es copiado. Debido a que la base anómala contiene un átomo

de nitrógeno en vez de un átomo de carbono, la enzima DNMT1 no puede reemplazar el grupo metilo ausente. Si esto continúa mientras las células se van dividiendo, la metilación del ADN empieza a diluirse.

Sucede algo más cuando las células que se dividen son tratadas con 5-azacitidina. Sabemos ahora que cuando DNMT1 se une a una región en la que el ADN contiene 5-azacitidina en vez de la citidina normal, la DNMT1 se queda pegada allí[6]. Esta enzima aislada es enviada luego a una parte diferente de la célula y descompuesta. Debido a ello, los niveles totales de la encima DNMT1 en la célula caen[7, 8]. La combinación de esta disminución en la cantidad de DNMT1 con el hecho de que la 5-azacitidina no puede ser metilada significa que la cantidad de metilación del ADN en la célula sigue cayendo. Veremos enseguida por qué esta caída en la metilación del ADN tiene un efecto anticancerígeno.

Así pues, la 5-azacitidina es un ejemplo de un lugar en el que se descubrió inesperadamente un agente anticancerígeno que actuaba epigenéticamente. Curiosamente, algo parecido sucedió con nuestro segundo ejemplo de un compuesto que recientemente ha sido autorizado para el tratamiento del cáncer[9].

Otra feliz casualidad

En 1971, la científica Charlotte Friend mostró que un compuesto muy simple llamado DMSO (su nombre completo es dimetil sulfóxido) producía un efecto singular en las células cancerígenas de un modelo de leucemia en ratones. Cuando estas células eran tratadas con DMSO se volvían de color rojo. Esto se debía a que activaban el gen de la hemoglobina, el pigmento que da su color a los glóbulos rojos[10]. Las células leucémicas normalmente no activan este gen y el mecanismo subyacente a este efecto del DMSO era completamente desconocido.

Ronald Breslow, de la Universidad de Columbia, y Paul Marks y Richard Rifkind, del Memorial Sloan-Kettering Cancer Center se sintieron intrigados por la investigación de Charlotte Friend. Ronald Breslow empezó a diseñar y a crear un nuevo conjunto de sustancias químicas utilizando la estructura del DMSO como punto de partida y luego añadiendo o cambiando partes, un poco como las combinaciones de un juego de construcción como el Lego. Paul Marks y Richard Rifkind empezaron a hacer pruebas con estas sustancias en varios modelos celulares. Algunos de estos compuestos producían un efecto diferente al del DMSO. Interrumpían el crecimiento de las células.

Tras muchas iteraciones y sacando las enseñanazas de cada nuevo y más complejo conjunto de estructuras, los científicos crearon una molécula llamada SAHA (ácido hidroxámico suberoilanilida). Este compuesto era realmente efectivo interrumpiendo el crecimiento y/o causando la muerte de las células en las líneas celulares cancerígenas[11]. Sin embargo, pasaron otros dos años antes de que el equipo fuese capaz de identificar qué estaba haciendo el ácido SAHA en las células. El momento clave se produjo más de 25 años después de la pionera publicación de Charlotte Friend, en 1990, cuando Victoria Richon, del equipo de Paul Mark, leyó un trabajo del grupo en la Universidad de Tokio.

El grupo japonés había estado trabajando en un compuesto llamado Tricostatina A o TSA. Se sabía que la TSA podía detener la proliferación celular. El grupo japonés mostró que el tratamiento con el TSA alteraba el grado en que las proteínas histonas son decoradas con el grupo químico acetilo en las líneas celulares cancerígenas. La acetilación de la histona es otra modificación epigenética que encontramos por vez primera en el capítulo 4. Cuando las células eran tratadas con TSA, subían los niveles de acetilación de la histona. Pero no era porque el compuesto activase las enzimas que ponen grupos acetilo en las histonas, sino porque la TSA inhibía las enzimas que quitaban grupos acetilo de estas proteínas de la cromatina. Estas proteínas se llaman deacetilasas de la histona o HDAC[12].

Victoria Richon comparó la estructura de la TSA con la estructura del SAHA, y ambas se muestran en la figura 11.2.

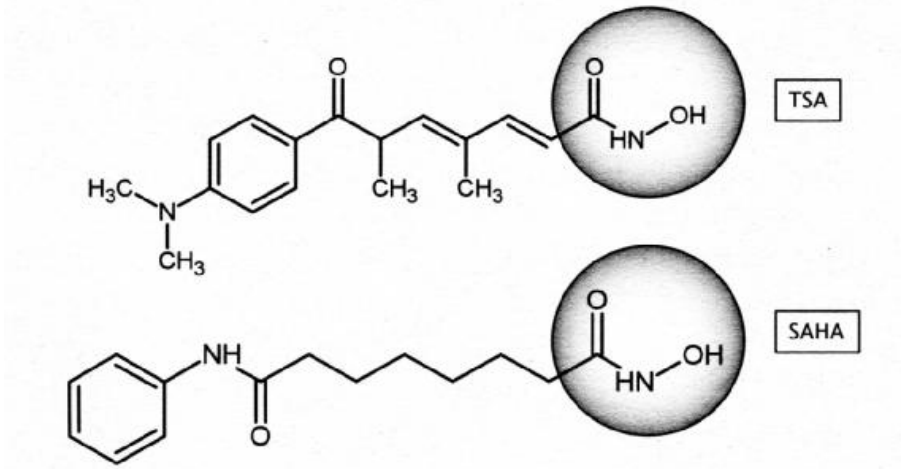

Figura 11.2: Estructuras de la TSA y del SAHA, con las áreas de mayor similaridad rodeadas por un círculo. C: Carbono; H: Hidrógeno; N: Nitrógeno; O: Oxígeno. Por simplicidad, algunos átomos de carbono no se muestran explícitamente, pero están presentes allí donde hay un enlace de dos líneas.

No hay que ser químico para ver que la TSA y el SAHA tienen una estructura muy parecida, especialmente en la parte derecha de cada molécula. Victoria Richon formuló la hipótesis según la cual el SAHA era, igual que la TSA, un inhibidor de las HDAC. En 1998, ella y sus colegas publicaron un trabajo en el que se demostraba que este era realmente el caso[13]. El SAHA impide a las enzimas HDAC quitar grupos acetilo de las proteínas histonas, y como consecuencia, las histonas acarrean montones de grupos acetilo.

Algo más que una coincidencia

Así, tanto la 5-azacitidina como el SAHA reducen la proliferación de las células cancerígenas, y ambos inhiben la actividad de las enzimas epigenéticas. Aunque podemos considerar este hecho como un prometedor respaldo a la teoría según la cual las proteínas epigenéticas son importantes en el cáncer, cabe preguntarse si no estaremos sacando una conclusión precipitada. Podría ser simplemente una coincidencia que ambas sustancias afectasen a las proteínas epigenéticas. Al fin y al cabo, las enzimas a las que apuntan los dos compuestos son muy diferentes. La 5-azacitidina inhibe las enzimas DNMT, que añaden grupos metilo al ADN. El SAHA, por otro lado, inhibe a la familia HDAC de enzimas, que quitan grupos acetilo de las proteínas histonas. Superficialmente, estos dos procesos parecen muy diferentes. ¿No será una coincidencia que tanto la 5-azacitidina

como el SAHA inhiban enzimas epigenéticas?

Los epigenetistas creen que no es ninguna coincidencia. Las enzimas ADN-metiltransferasas añaden un grupo metilo a la base citidina. Altas concentraciones de esta base se encuentran en los largos fragmentos de ADSN ricos en C y G llamados islas CpG. Estas islas se encuentran al principio de los genes, en las regiones promotoras que controlan la expresión del gen. Cuando el ADN o una isla CpG están muy metilados, el gen controlado por ese promotor se desactiva. Dicho de otro modo, la metilación del ADN es una modificación represiva. La actividad de la DNMT aumenta la metilación del ADN y reprime por consiguiente la expresión del gen. Inhibiendo a estas enzimas con la 5-azacitidina podemos estimular la expresión del gen.

Las proteínas histonas también se encuentran en los promotores de los genes. Las modificaciones de las histonas pueden ser muy complejas, como vimos en el capítulo 4. Pero la acetilación de una histona es la más sencilla por lo que respecta a sus efectos sobre la expresión de un gen. Si las histonas en la parte inicial de un gen están muy metiladas, es probable que el gen se exprese bien. Si las histonas no están acetiladas, es probable que el gen esté desactivado. La desacetilación de una histona es un cambio represivo. Las deacetilasas de histona (HDAC) quitan grupos acetilo de las proteínas histonas y por tanto reprimen la expresión del gen. Inhibiendo a estas enzimas con el SAHA podemos estimular la expresión del gen.

Tenemos, pues, un dato consistente. Estos dos compuestos no relacionados que controlan el crecimiento de las células cancerígenas en cultivos y que han sido recientemente autorizados para el tratamiento del cáncer en humanos, inhiben enzimas epigenéticas. Y con ello fomentan la expresión de los genes, lo que plantea la cuestión de por qué esto es útil en el tratamiento del cáncer. Para entenderlo hemos de adentrarnos un poco en la biología del cáncer.

Introducción a la biología del cáncer

El cáncer es el resultado de una proliferación anormal e incontrolada de las células. Normalmente, las células de nuestro cuerpo se dividen y proliferan al ritmo adecuado. Esto lo controla un complejo equilibrio que se establece entre las redes de genes de nuestras células. Algunos genes promueven la proliferación celular. Estos genes se conocen a veces como proto-oncogenes. Están representados por el signo + en el diagrama del balancín del capítulo anterior. Otros genes contienen a la célula impidiendo que prolifere demasiado. Estos genes se conocen como supresores de tumores. Están

representados por el signo – en el mismo diagrama.

Los proto-oncogenes y los supresores de tumores no son intrínsecamente buenos o malos. En las células sanas, las actividades de estas dos clases de genes se equilibran. Pero cuando la regulación de estas redes falla, la proliferación celular puede descontrolarse. Si un proto-oncogen se vuelve excesivamente activo puede llevar a una célula a un estado canceroso. A la inversa, si un supresor de tumores es desactivado ya no actuará como freno de la división celular. El resultado es el mismo en ambos casos –la célula puede empezar a proliferar demasiado rápidamente.

Pero el cáncer no es solo el resultado de un exceso de proliferación celular. Si las células se dividen demasiado rápidamente, pero son por lo demás normales, forman esas estructuras que llamamos tumores benignos. Estos pueden ser antiestéticos e incómodos, pero a menos que compriman un órgano vital y afecten su funcionamiento, es poco probable que en sí mismos resulten fatales. En el cáncer de verdad, las células no solo se dividen demasiado a menudo, también son anómalas y pueden empezar a invadir otros tejidos.

Un lunar es un tumor benigno. Y lo mismo puede decirse de las tumoraciones que se forman en el interior del intestino grueso y que llamamos pólipos. Ni un lunar ni un pólipo son peligrosos en sí mismos. El problema es que cuantos más lunares o pólipos se tienen, mayor es la probabilidad de que alguno de ellos pase a la siguiente fase y desarrolle una anomalía que lo lleve a convertirse en un auténtico cáncer.

Esto implica algo importante, que se ha puesto en evidencia en varios estudios. El cáncer no es un fenómeno excepcional. Es un proceso de varias fases en el que cada paso adicional lleva a una célula más allá en el camino de volverse maligna. Esto es cierto incluso en aquellos casos en los que los pacientes heredan una fuerte predisposición al cáncer. Un ejemplo es el cáncer de mama premenopáusico que se da en algunas familias. Las mujeres que heredan una copia mutada de un gen llamado BRCA1 están en un riesgo muy elevado de sufrir un cáncer de mama temprano, muy agresivo y difícil de tratar. Pero ni siquiera estas mujeres nacen con un cáncer de mama activo. Tienen que pasar muchos años antes de que el cáncer se desarrolle, porque tienen que acumularse otros defectos también.

Así pues, las células acumulan defectos a medida que se van acercando a volverse cancerosas. Estos defectos tienen que transmitirse de célula madre a célula hija, porque de otro modo se perderían cada vez que una célula se divide. Estos defectos tienen que ser heredables a medida que el cáncer se desarrolla. Comprensiblemente, durante mucho tiempo, la atención de la

comunidad científica se centró en identificar mutaciones en los genes implicados en el desarrollo del cáncer. Buscaban alteraciones en el código genético, el programa fundamental. Estaban particularmente interesados en los genes supresores de tumores, ya que estos son los genes que normalmente mutaban en los síndromes de cáncer hereditarios.

Los humanos tienden a tener dos copias de cada gen supresor de tumores, ya que la mayoría de ellos se encuentran en los autosomas. A medida que una célula se va volviendo cancerosa, las dos copias de los genes supresores de tumores son desactivadas. En muchos casos, esto puede ser debido a que el gen haya mutado en las células cancerígenas. Esto se conoce como mutación somática –algo que ha sucedido en las células corporales en algún momento durante la vida normal. Se las llama mutaciones somáticas para distinguirlas de las mutaciones genéticas, las que se transmiten de padres a hijos. Las mutaciones que desactivan las dos copias de un supresor de tumores pueden ser muy variables. En algunos casos puede haber cambios en la secuencia de aminoácidos, de modo que los genes ya no pueden producir proteínas funcionales. En otros casos puede darse la pérdida de la parte relevante del cromosoma en las células crecientemente cancerosas. En un paciente individual, una copia de un gen supresor de tumores puede llevar una mutación que cambia la secuencia de aminoácidos, y la otra puede haber sufrido una deleción.

Está muy claro que estas cosas suceden y con bastante frecuencia, pero a menudo es bastante difícil identificar exactamente cómo un supresor de tumores ha mutado. En los últimos quince años, hemos empezado a darnos cuenta de que hay otra forma de desactivar a un gen supresor de tumores. El gen puede silenciarse epigenéticamente. Si el ADN en el promotor está excesivamente metilado o si las histonas están cubiertas de modificaciones represivas, el supresor de tumores puede desactivarse. El gen ha sido desactivado sin cambiar el programa subyacente.

La frontera epigenética en el cáncer

Varios laboratorios han identificado cánceres en los que claramente ha ocurrido esto. Uno de los primeros informes al respecto fue sobre un tipo de cáncer de riñón llamado carcinoma renal de células claras. Una fase clave en el desarrollo de este tipo de cáncer es la desactivación de un gen supresor de tumores llamado VHL. En 1994, un grupo encabezado por el influyente Stephen Baylin, de la John Hopkins Medical Institution de Baltimore analizó la isla CpG frente al

gen VHL. En el 19 por ciento de las muestras de carcinoma renal de células claras que analizaron, el ADN de la isla estaba hipermetilado. Esto desactivaba la expresión de este gen supresor de tumores, y ello era casi con toda certeza un hecho importante en la progresión del cáncer en estos individuos[14].

La metilación del promotor no se limitaba al supresor de tumores VHL y al cáncer renal. El profesor Baylin y sus colegas analizaron posteriormente el gen supresor de tumores BRCA1 en el cáncer. Analizaron casos en los que no había un historial familiar de la enfermedad y el cáncer no había sido causado por las mutaciones en BRCA1 de las que hemos hablado unos párrafos más arriba. En el 13 por ciento de estos casos esporádicos de cáncer de mama, la isla CpG del BRCA1 estaba hipermetilada[15]. Jean-Pierre Issa, del MD Anderson Cancer Center de Houston, en colaboración con Stephen Baylin, informó de la gran extensión de unos patrones anormales de metilación del ADN en los cánceres. Issa y Baylin pusieron de manifiesto que más del 20 por ciento de cánceres de colon tenían unos niveles elevados de metilación del promotor del ADN en muchos genes diferentes simultáneamente[16].

Trabajos posteriores mostraron que no es solo la metilación del ADN lo que cambia en el cáncer. No hay pruebas directas de modificaciones de las histonas que lleven a la represión de los genes supresores de tumores. Las histonas asociadas con un gen supresor de tumores llamado ARH1, por ejemplo, tenían unos bajos niveles de acetilación en el cáncer de mama[17]. Una relación similar existe para el gen supresor de tumores PERI en una forma de cáncer de pulmón llamado de células no pequeñas[18]. En ambos casos se daba una relación entre los niveles de acetilación de las histonas y la expresión del gen supresor de tumores –cuanto menores eran los niveles de acetilación, menor era la expresión del gen. Debido a que estos dos genes son supresores de tumores, la disminución de su expresión significaría que la célula tendría muchas más dificultades para frenar la proliferación.

Este descubrimiento –el de que los genes supresores de tumores a menudo son silenciados por mecanismos epigenéticos– ha provocado una gran excitación en el ámbito médico, porque potencialmente crea una nueva forma de tratar el cáncer. Si uno puede reactivar los genes supresores de tumores en las células cancerígenas, existe la posibilidad de frenar el índice de proliferación de estas células. El tren desbocado no puede avanzar tan deprisa por la vía.

Cuando los científicos pensaron que los supresores de tumores eran desactivados por mutaciones o deleciones, no teníamos muchas opciones para reactivar estos genes. Hay ensayos en marcha para verificar si la terapia génica puede utilizarse para hacerlo. En determinadas circunstancias, es posible que la terapia génica resulte

efectiva, pero no es en absoluto seguro. La terapia génica se ha esforzado en hacer efectivas las esperanzas depositadas inicialmente en esta tecnología en toda clase de enfermedades. Puede ser muy difícil introducir los genes en las células adecuadas y activarlos una vez que están allí. Incluso cuando podemos hacerlo, a menudo resulta que el cuerpo se libra de estos genes extra, con lo que se pierde el beneficio inicialmente obtenido. En algunos casos relativamente raros también ha sucedido que la propia terapia génica ha provocado un cáncer, porque ha tenido efectos inesperados que han incrementado la proliferación celular. La comunidad científica no ha renunciado a la esperanza de la terapia génica y en el caso de algunas enfermedades puede que sea el enfoque más adecuado[19]. Pero en enfermedades como el cáncer, en los que se necesita tratar a mucha gente, esta terapia es cara y difícil.

Es por ello que hay tanta excitación respecto al desarrollo de drogas epigenéticas para el tratamiento del cáncer. Por definición, los cambios epigenéticos no alteran el código del ADN subyacente. Como hemos visto, hay pacientes en los que una copia del gen supresor de tumores ha sido silenciado por la acción de enzimas epigenéticas. En estos pacientes, el código de la proteína del supresor de temores normal no ha sido corrompido por una mutación. Por tanto, en su caso, cabe la posibilidad de que el tratamiento con las drogas epigenéticas adecuadas pueda revertir el patrón anómalo de metilación del ADN o de acetilación de las histonas. Si lo logramos, el gen supresor de temores tumores normal será reactivado y esto ayudará a poner de nuevo a raya a las células cancerígenas.

La Food and Drug Administration (FDA), la agencia del Ministerio de Salud de Estados Unidos, ha autorizado con fines clínicos el uso de dos drogas que inhiben la enzima DNMT1 en pacientes de cáncer. Estas dos drogas son la 5-azacitidina (nombre comercial Vidaza) y la estrechamente relacionada con ella 2-aza-5'-deoxicitidina (nombre comercial Dacogen). También han sido autorizados dos inhibidores de deacetilasas de histona (HDAC). Estos inhibidores son el SAHA (nombre comercial Zolinza), el ácido hidroxámico que ya hemos encontrado anteriormente, y una molécula llamada romidepsina (nombre comercial Istodax), que tiene una estructura química muy diferente a la del SAHA, pero que también inhibe a las enzimas HDAC.

A consecuencia del logro que fue desentrañar el papel molecular de la 5-azacitidina, Peter Jones, junto con Stephen Baylinb y Jean-Pierre Isa, ha tenido un papel enormemente influyente en los últimos 30 años llevando este compuesto desde el laboratorio, y a través de los ensayos clínicos pertinentes, a la categoría de producto autorizado. Victoria Richon desempeñó un papel igual de importante en el paso del ácido SAHA por este mismo proceso.

La autorización de estos cuatro compuestos contra dos tipos diferentes de enzimas ha dado un gran impulso al campo de las terapias epigenéticas. Pero no han demostrado ser drogas milagrosas universales, la bala de plata capaz de acabar con todos los cánceres.

Dejad de buscar milagros

Esto no ha sido ninguna sorpresa para quienes trabajan en los campos de la investigación y el tratamiento del cáncer. A veces parece que determinados periodistas de la prensa popular tienen una obsesiva propensión a escribir acerca de la cura del cáncer. Hablando en general, los científicos tratan detratan de evitar ser demasiado dogmáticos, pero si hay una cosa en la que están todos de acuerdo es en que nunca habrá una sola cura para el cáncer.

Esto es así porque no hay una sola forma de cáncer. Hay probablemente más de cien enfermedades diferentes con este nombre. Incluso si tomamos solo un ejemplo –digamos, el cáncer de mama– encontramos que hay diferentes tipos de esta variedad particular de cáncer. Algunos crecen en respuesta a la hormona femenina llamada estrógeno. Otros responden más fuertemente a una proteína llamada factor de crecimiento epidermal. El gen BRCA1 es desactivado o mutado en algunos casos de cáncer de mama, pero no en otros. Algunos cánceres de mama no responden a ninguno de los factores de crecimiento del cáncer conocidos, sino a otras señales que aún no somos capaces de identificar.

Debido a que el cáncer es un proceso de varias fases, dos pacientes cuyos cánceres parecen muy similares pueden haber enfermado debido a procesos moleculares muy diferentes. Sus cánceres pueden tener combinaciones bastante diferentes de mutaciones, modificaciones epigenéticas y otros factores que dirigen el crecimiento y la agresividad del tumor. Esto significa que es probable que diferentes pacientes requieran diferentes tipos y combinaciones de drogas anticancerígenas.

Incluso teniendo en cuenta esto, sin embargo, los resultados de los ensayos clínicos con inhibidores de las DNMT y las HDAC han sido sorprendentes. Hasta ahora ninguno de ellos ha demostrado funcionar bien en tumores sólidos como los cánceres de mama, colon o próstata. En cambio, son más efectivos contra cánceres que se han desarrollado a partir de células que dan origen a los glóbulos blancos de la corriente sanguínea que forman parte de nuestros sistemas de defensa contra los patógenos. Estos se conocen como tumores hematológicos. No está claro por qué las drogas epigenéticas actuales no parecen ser

efectivas contra los tumores sólidos. Es posible que en estos tumores haya mecanismos moleculares diferentes de los que están en marcha en los cánceres hematológicos. Alternativamente, podría ser que las drogas no pudiesen entrar en los tumores sólidos a concentraciones lo suficientemente elevadas como para afectar a la mayoría de las células cancerígenas.

Incluso dentro de los tumores hematológicos, hay diferencias entre las drogas inhibidoras de las DNMT y las HDAC. Los inhibidores de las DNMT han sido autorizados para utilizarlos en una enfermedad llamada síndrome mielodisplástico[20, 21]. Esta es una enfermedad que afecta a la médula ósea.

Los inhibidores de las HDAC han sido autorizados para un tipo diferente de tumor hematológico llamado linfoma cutáneo de células T[22]. En esta enfermedad la piel es infiltrada por unas células inmunológicas proliferantes llamadas células T, que crea unas placas visibles y unas lesiones de grandes dimensiones.

No todos los pacientes aquejados por el síndrome mielodisplástico o por el linfoma cutáneo de células T obtienen un beneficio clínico tomando estas drogas. Incluso entre los pacientes que responden positivamente a su administración, ninguna de estas drogas parece curar la enfermedad. Si los pacientes dejan de tomar la medicación, el cáncer recupera el control. Los inhibidores de la DNMT1 y de las HDAC parecen contener el crecimiento de las células cancerígenas, retrasándolo y reprimiéndolo. No curan sino que controlan.

Sin embargo, esto a menudo representa una mejora importante para los pacientes, ya que prolonga su esperanza de vida y mejora la calidad de la misma. Por ejemplo, muchos pacientes con linfoma cutáneo de células T tienen muchas molestias porque las lesiones que padecen producen dolor y una comezón

terrible. Los inhibidores de las HDAC calman a menudo eficazmente este aspecto del cáncer, incluso en pacientes cuyo límite de supervivencia no mejora con la administración de estas drogas.

Hablando en general, a menudo es difícil saber qué pacientes podrán beneficiarse de una droga anticancerígena concreta. Este es uno de los principales problemas con los que se enfrentan las compañías que trabajan en nuevas terapias epigenéticas para el tratamiento del cáncer. Incluso hoy, varios años después de la concesión por parte de la FDA de las primeras licencias a la 5-azacitidina y al SAHA, todavía no sabemos por qué son mucho más eficaces en el síndrome mielodisplástico y en el linfoma cutáneo de células T que en otros cánceres. Simplemente resultó que en los primeros ensayos clínicos en humanos, los pacientes que tenían estas enfermedades respondieron mejor que otros pacientes con otros tipos de cáncer. Cuando los médicos que realizaban los ensayos se dieron

cuenta de esto, diseñaron los nuevos ensayos clínicos centrándose en estos grupos de pacientes.

Esto puede no parecer una gran dificultad. Lo más sencillo es que las compañías farmacéuticas desarrollen drogas y las prueben en todo tipo de cánceres y en combinación con otros medicamentos, para averiguar cuál es el mejor uso que puede dárseles.

El problema es el precio. Si consultamos la página web del National Cancer Institute, podremos ver el número de ensayos que están en marcha para cada fármaco en concreto. En febrero del 2011 se estaban llevando a cabo 88 ensayos con el SAHA[23]. Es difícil obtener los costes finales de un ensayo clínico, pero basándonos en datos del 2007, un valor de unos 20.000 dólares por paciente es probablemente una estimación conservadora[24]. Suponiendo que en cada ensayo participan veinte pacientes, esto significa que el coste de poner a prueba el SAHA en los ensayos del National Cancer Institute supera los 35.000.000 de dólares. Y esta es casi con certeza una estimación a la baja del precio total.

Los investigadores de la Universidad de Columbia y del Memorial Sloan-Kettering Cancer Center que desarrollaron por vez primera el SAHA lo patentaron y después fundaron una compañía llamada Aton Pharma para lanzar el medicamento. El año 2004, tras unos primeros resultados prometedores con el linfoma cutáneo de células T Aton Pharma fue adquirida por la compañía Merck, el gigante de la industria farmacéutica, por más de 120 millones de dólares. Aton Pharma había invertido seguramente millones de dólares para llevar al SAHA hasta esta fase. El descubrimiento y el desarrollo de un fármaco es un negocio caro. Las dos compañías que comercializaron los inhibidores de la DNMT1 han sido adquiridas recientemente por grandes compañías farmacéuticas por unas cifras superiores a los 3.000 millones de dólares en ambos casos[25]. Cuando una compañía ha pagado una cantidad enorme de dinero para desarrollar o para comprar un nuevo fármaco, seguramente prefiere no tener que gastar mucho dinero haciendo ensayos clínicos.

Naturalmente sería un gran avance si pudiéramos hacer ensayos clínicos teniendo una idea más precisa de a qué pacientes puede beneficiar un fármaco, y no dando palos de ciego. Lamentablemente, la mayoría de investigadores opinan que muchos de los modelos animales utilizados para ensayar drogas anticancerígenas son muy limitados en su capacidad de predecir los cánceres humanos más susceptibles. Para ser justos, esto no es solo cierto de los fármacos anticancerígenos orientados a las enzimas epigenéticas, también lo es de la mayor parte de fármacos oncológicos.

En su intento de evitar este problema, los investigadores, tanto en el mundo académico como en la industria farmacéutica, están buscando

actualmente la nueva generación de objetivos energéticos en oncología. La DNMT1 es una enzima de acción relativamente amplia. La metilación del ADN es un asunto de todo o nada –un CpG está metilado o no lo está. Las HDAC también tienden a ser poco discriminatorias. Si pueden acceder a una lisina acetilada en la cola de una histona, quitan ese grupo. Hay muchas lisinas en la cola de una histona –hay siete en la histona H3, para empezar. Son por lo menos diez las enzimas HDAC diferentes que el SAHA puede inhibir. Es probable que cualquiera de estas diez enzimas pueda desacetilar a cualquiera de las siete lisinas de la cola de H3. Esto no es precisamente lo que calificaríamos de ajuste fino.

No hay victorias fáciles

Esta es la razón de que el campo se esté moviendo ahora en la dirección de evaluar diferentes enzimas epigenéticas, mucho más limitadas en sus acciones, para averiguar cuáles de ellas son actores importantes en los cánceres. La lógica subyacente es que será más fácil entender la biología celular de las enzimas con una acción limitada, y que ello facilitará determinar qué pacientes tienen más probabilidades de responder a cada tipo de fármaco.

El primer problema que ello plantea es bastante grande. ¿Qué proteínas habría que investigar? Existen al menos cien enzimas que ponen o quitan modificaciones de las histonas (escritores y borradores del código epigenético). Existen probablemente otras tantas capaces de leer el código genético. Para colmo, muchos de estos escritores, borradores y lectores interactúan entre sí. ¿Cómo podemos empezar a identificar cuáles son los más prometedores candidatos para los programas de descubrimiento de nuevas drogas?

No tenemos ningún compuesto útil como la 5-azacitidina y el SAHA para orientarnos, por lo que tenemos que fiarnos de nuestros conocimientos relativamente incompletos sobre el cáncer y la epigenética. Un área que está demostrando ser útil es considerar de qué modo trabajan en tándem las modificaciones de las histonas y el ADN.

Las áreas más fuertemente reprimidas del genoma tienen unos elevados niveles de metilación del ADN y están sumamente compactadas. El ADN está estrechamente enrollado y es excepcionalmente inaccesible a las enzimas que transcriben los genes. Pero lo realmente importante es saber por qué estas regiones están tan fuertemente reprimidas. El modelo se muestra en la figura 11.3.

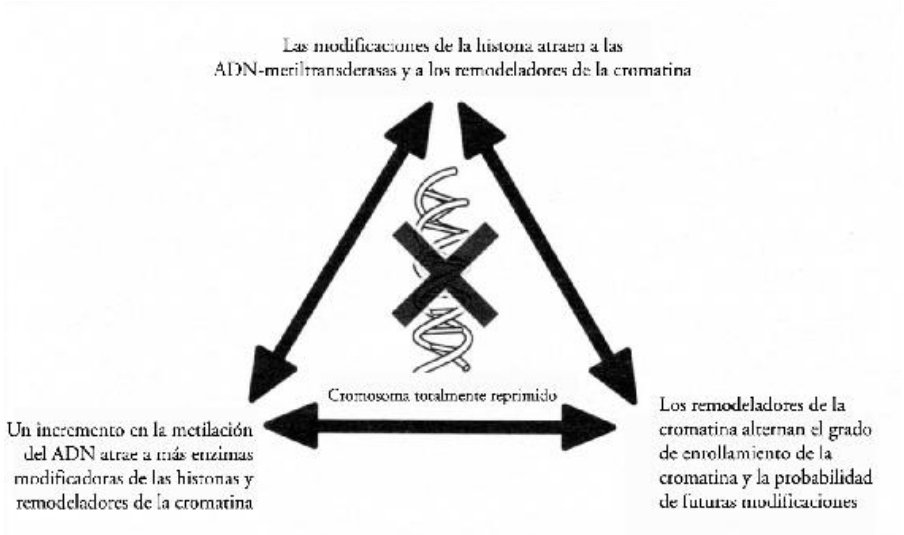

Figura 11.3: Dibujo esquemático que ilustra cómo diferentes tipos de modificaciones epigenéticas actúan conjuntamente para crear una región cromosómica muy condensada y progresivamente más reprimida, lo que dificulta que las células expresen los genes de esta región.

En este modelo hay un círculo vicioso de acontecimientos que tiene como resultado la generación de un estado cada vez más reprimido. Una de las predicciones de este modelo es que las modificaciones represivas de las histonas atraen a las ADN-metiltransferasas, que depositan la metilación del ADN cerca de estas histonas. Esta metilación, a su vez, atrae más enzimas modificadoras de las histonas, creando un círculo vicioso que lleva a una región cada vez más hostil a la expresión de los genes.

Los datos experimentales sugieren que en muchos casos este modelo parece correcto. Las modificaciones represivas de las histonas pueden actuar como cebo para atraer la metilación del ADN al promotor de un gen supresor de tumores. Un ejemplo clave de esto es una enzima epigenética que encontramos en el capítulo anterior llamada EZH2. La proteína EZH2 añade grupos metilo al aminoácido lisina en la posición 27 de la histona H3. Este aminoácido es conocido como H3K27. K es la inicial que se utiliza como código de la lisina (la L es el código de otro aminoácido llamado leucina).

Esta metilación de H3K27 tiende a desactivar la expresión del gen. Sin embargo, al menos en algunos tipos de célula de mamífero esta metilación de la histona atrae ADN-metiltransferasas a la misma región de la cromatina[26, 27]. Entre las ADN-metiltransferasas están la DNMT3A y la DNMT3B. Esto es importante porque la DNMT3A y la DNMT3B pueden efectuar el proceso llamado metilación de novo del ADN. Es decir, pueden metilar ADN virgen y crear regiones

completamente nuevas de cromatina muy reprimida. En consecuencia, la célula puede convertir una marca represiva relativamente inestable (metilación H3K27) en la más estable metilación del ADN.

Otras enzimas también son importantes. Una enzima llamada LSD1 quita grupos metilo de las histonas –es un borrador de modificaciones epigenéticas[28]. Hace esto de un modo particularmente fuerte en la posición 4 de la histona H3 (H3K4). H3K4 es lo contrario de H3K27, porque cuando no hay grupos metilo en H3K4 los genes tienden a estar desactivados.

La H3K4 no metilada puede ligar proteínas, y una de estas se llama DNMT3L. No será, pues, ninguna sorpresa si digo que está relacionada con DNMT3A y DNMT3B. DNMT3L no metila el ADN por sí misma, pero atrae a DNMT3A y a DNMT3B a la H3K4 no metilada. Esto proporciona otra forma de dirigir la metilación estable del ADN a territorio virgen[29].29

Con toda probabilidad, muchas histonas posicionadas en los promotores de genes supresores de tumores llevan estas dos marcas de histona represivas –metilación de H3K27 y no metilación de H3K4– y estas actúan conjuntamente para dirigirse a las ADN –metiltransferasas aún más fuertemente.

Tanto EZH2 como LSD1 están sobre-reguladas en ciertos tipos de cáncer, y su expresión se corresponde con la agresividad del cáncer y con una escasa supervivencia de los pacientes[30, 31]. Básicamente, cuanto más activas son estas enzimas, peor es la prognosis para el paciente.

De este modo, los caminos de las modificaciones de las histonas y la metilación del ADN interactúan. Esto puede explicar al menos en parte uno de los misterios de las terapias genéticas existentes. ¿Por qué compuestos como la 5-azacitidina y el SAHA son solo controladores y no destructores completos de las células cancerígenas?

En nuestro modelo, el tratamiento con 5-azacitidina reduce la metilación del ADN mientras los pacientes toman la droga. Desgraciadamente, muchas drogas anticancerígenas tienen efectos secundarios graves, y los inhibidores DNMT no son una excepción. Los efectos secundarios pueden llegar a convertirse en un problema tan grave que el paciente tiene que dejar de tomar la droga. Sin embargo, las células cancerígenas del paciente probablemente todavía tienen modificaciones de las histonas en los genes supresores de tumores. Una vez que el paciente deja de tomar 5-azacitidina, estas modificaciones de las histonas casi con certeza empiezan a atraer de nuevo a las enzimas DNMT, reiniciando la represión estable de la expresión de los genes.

Algunos investigadores están llevando a cabo ensayos clínicos utilizando juntamente 5-azacitidina y SAHA para tratar de interferir

en este ciclo, perturbando tanto a los componentes del ADN y de las histonas del silenciamiento genético. No está todavía claro si estos ensayos tendrán resultados positivos. Si no los tienen, probablemente habrá que deducir que no son los bajos niveles de acetilación de las histonas lo más importante para restablecer la metilación del ADN. Podría ser que las modificaciones concretas de las histonas del tipo que acabamos de describir fuesen más importantes. Pero todavía no tenemos drogas que inhiban a ninguna de las demás enzimas epigenéticas, o sea que en estos momentos no tenemos otra opción.

En el futuro es posible que no tengamos que utilizar en absoluto inhibidores DNMT. El vínculo entre la metilación del ADN y las modificaciones de las histonas en el cáncer no es absoluto. Si una isla CpG es metilada, el gen que viene después es reprimido. Pero hay genes supresores de tumores que están antes de las islas CpG no metiladas, y genes supresores de tumores que no tienen islas CpG. Estos genes pueden también estar reprimidos, pero solo gracias a las modificaciones de las histonas[32]. Esto lo ha puesto en evidencia Jean-Pierre Issa en el MD Anderson Cancer Center de Houston, que ha jugado un papel decisivo en la implementación de las terapias epigenéticas en el ámbito clínico. En estos casos, si podemos encontrar las enzimas epigenéticas adecuadas para dirigirlas a estos inhibidores, podemos lograr la re-expresión de los supresores de tumores sin tener que preocuparnos de la metilación del ADN.

Una tregua precaria

¿Hay algo especial en los genes supresores de tumores que sea silenciado al usar modificaciones epigenéticas? Hay dos teorías diferentes al respecto. La primera es que no hay nada especial en estos genes y que el proceso es totalmente aleatorio. En este modelo, de vez en cuando un supresor de tumores es aleatoriamente modificado epigenéticamente. Si esto cambia la expresión del gen, puede significar que las células con esta modificación epigenética crecen un poco más rápidamente o un poco mejor que sus vecinas. Esto da a las células una ventaja en su crecimiento respecto a las que la rodean, y de este modo acumulan gradualmente más cambios epigenéticos y genéticos que las vuelven más cancerosas.

La otra teoría es que los supresores de tumores que son reprimidos epigenéticamente son de algún modo el objetivo en este proceso. No es pura mala suerte, sino que estos genes tienen realmente un riesgo superior de ser silenciados epigenéticamente.

Recientemente, desde que disponemos de la tecnología para hacer

trazar el perfil de las modificaciones epigenéticas en más y más tipos de células, y con resoluciones cada vez mayores, el campo se ha decantado a favor de este segundo modelo. Hay un conjunto de genes que parecen propensos a desactivarse ellos mismos epigenéticamente.

Al principio esto parece muy contraintuitivo. ¿Por qué demonios miles de millones de años de evolución iban a dejarnos con unos sistemas celulares que nos hacen propensos a los cambios cancertígenos? Bueno, hemos de poner las cosas en su contexto. La mayor parte de las presiones evolutivas están conectadas con el hecho de dejar el máximo de descendientes posible. Para que un humano alcance la edad reproductiva, es muy importante que el desarrollo temprano sea lo más eficiente posible. A fin de cuentas, uno no puede reproducirse si no pasa de la fase embrionaria. Y una vez alcanzada la edad reproductiva y tras haber tenido la oportunidad de reproducirse, hay muy poco a ganar en términos evolutivos permaneciendo vivo muchas más décadas.

La evolución ha favorecido aquellos mecanismos celulares que promueven un crecimiento y un desarrollo temprano más eficaces, incluida la producción de múltiples tipos de tejidos diferentes. Muchos de estos tipos de tejidos contienen depósitos de células madre específicos del propio tejido. Nuestros cuerpos necesitan estos depósitos para el crecimiento de los tejidos cuando estamos madurando y para la regeneración de los tejidos después de sufrir una herida. El destino y la identidad de estas células madre específicas de cada tipo de tejido los controlan unos patrones precisos de modificaciones epigenéticas. Utilizando modificaciones epigenéticas para controlar la expresión de los genes, las células mantienen cierta flexibilidad. Tienen el potencial de convertirse en células más especializadas, por ejemplo. Y lo que es aún más importante con respecto al cáncer es que las modificaciones epigenéticas también permiten que las células se dividan para formar nuevas células madre. Esto explica que no nos quedemos sin células epiteliales o sin células medulares aunque vivamos más de cien años.

Esta necesidad de patrones de expresión genética que no estén completamente determinados es probablemente la razón de que la represión epigenética de los genes supresores de tumores no sea un proceso aleatorio. No podemos tener las dos cosas. Los sistemas reguladores que permiten a las células ser flexibles son también los sistemas que hacen posible que las células se equivoquen. En términos evolutivos, este es un precio que tenemos que pagar. Nuestros caminos epigenéticos garantizan que algunas de nuestras células no sean completamente pluripotentes o completamente diferenciadas. En vez de ello se mantienen en algún lugar cerca de la parte superior del paisaje epigenético de Waddington, pero listas para rodar colina abajo

en cualquier momento.

Peter Laird, que como Peter Jones trabaja en la Universidad de California del Sur, ha mostrado los efectos en cadena de este sistema en las células cancerígenas. Su equipo analizó los patrones de metilación del ADN en células cancerígenas, centrándose especialmente en los promotores de los genes supresores de tumores. Los genes supresores de tumores cuyas histonas están metiladas por el complejo EZH2 en las células ES tenían una probabilidad doce veces mayor de tener unos niveles de metilación anormalmente elevados que la que tenían aquellos genes que no son objetivo del complejo EZH2. Peter Laird describió este efecto de forma elegante, diciendo que "la represión reversible de un gen es sustituida por el silenciamiento permanente, encerrando a la célula en un estado perpetuo de auto-renovación y predisponiéndola, por consiguiente, a subsecuentes transformaciones malignas (sic)"[33]. Esto es consistente con la idea de que en el cáncer hay un aspecto de célula troncal. Si las células quedan encerradas en un estado de célula troncal en el que no pueden diferenciarse y convertirse en las células del fondo del paisaje epigenético, se vuelven muy peligrosas porque siempre podrán dividirse y formar más células como ellas mismas.

Jean-Pierre Issa ha descrito a los genes que son epigenéticamente silenciados en el cáncer de colon como los "porteros". Frecuentemente son genes cuyo papel normal es alejar a las células de la auto-renovación y acercarlas al estado de células completamente diferenciadas. La desactivación de estos genes en el cáncer encierra a las células en un estado auto-renovador de célula troncal. Esto crea una población de células capaz de seguir dividiéndose, acumulando futuros cambios epigenéticos y mutaciones y acercándose poco a poco a un estado plenamente cancerígeno[34].

Cuando visualizamos a las células en el paisaje de Waddington, es difícil visualizar a las que permanecen en alguna parte de la cima. Esto se debe a que instintivamente sabemos que la cima es un lugar realmente poco estable. Una bola que ha empezado a rodar por una pendiente seguirá rodando a menos que algo la detenga. E incluso si la bola llega a detenerse, siempre cabrá la posibilidad de que vuelva a moverse de nuevo colina abajo.

¿Qué es lo que mantiene a las células en esta tambaleante posición? El año 2006 un grupo encabezado por Eric Lander en el Broad Institute de Boston, encontró parte de la respuesta a esta pregunta. Un conjunto clave de genes en las células ES, las células pluripotentes que hemos llegado a conocer tan bien, resultó tener un patrón de modificación de las histyonas realmente extraño. Eran genes que tenían mucha importancia a la hora de controlar si una célula ES seguía siendo pluripotente o se diferenciaba. La histona H3K4 era

metilada en estos genes, lo que normalmente se asocia con la activación de la expresión de un gen. H3K27 también estaba metilada, y esto se asocia normalmente con la desactivación de la expresión de un gen. Así pues, ¿qué modificación acababa siendo la más fuerte? Los genes, ¿se activaban o se desactivaban?

La respuesta resultó ser: las dos cosas. O ninguna, en función de cómo lo consideremos. Estos genes se encontraban en un estado "suspendido". En presencia del más pequeño estímulo –un cambio en las condiciones del cultivo celular que empujase a las células a diferenciarse, por ejemplo–, una u otra de estas metilaciones se perdía. El gen era completamente activado o fuertemente reprimido, dependiendo de la modificación epigenética[35].

Esto es realmente importante en el cáncer. Stephen Baylin es la tercera persona, junto con Peter Jones y Jean-Pierre Issa, que más ha hecho para convertir las terapias epigenéticas en una realidad. Ha puesto en evidencia que estas modificaciones de las histonas "en suspensión" se encuentran en las células troncales cancerígenas y son realmente importantes a la hora de establecer los patrones de metilación del ADN en las células cancerígenas[36].

Por supuesto, tiene que haber otros elementos en juego. Muchas personas no desarrollan cáncer por muchos años que vivan. Algo tiene que sucederles a las personas que desarrollan cáncer que hace que el patrón normal de células troncales se vea trastocado, de modo que las células se quedan atrapadas en un estado agresiva y anormalmente proliferativo. Sabemos que el entorno puede tener un impacto sustancial en el riesgo de sufrir cáncer (basta pensar en el enorme incremento de la posibilidad de sufrir cáncer de pulmón que tienen los fumadores), pero no tenemos claro de qué modo, si es que lo hace, interfiere el entorno con estos procesos epigenéticos.

Puede también que haya un aspecto de pura mala suerte en quienes desarrollan un cáncer. Probablemente todos tenemos fluctuaciones aleatorias en los niveles, actividad o localización de las proteínas que leen, escriben, interpretan y borran nuestros códigos epigenéticos. Y también hay ARN no codificantes.

La RNT 3' de DNMT3A y de DNMT3B del ARNm contiene lugares de unión para una familia de miARN llamada miR-29. Normalmente, estos miARN se ligan a las moléculas de DNMT3A y de DNMT3B del ARNm y las regulan a la baja. En el cáncer de pulmón, los niveles de estos miARN caen, y como consecuencia de ello las DNMT3A y DNMT3B del ARNm, y posteriormente la expresión de las proteínas es elevada. Esto es probable que incremente la cantidad de la metilación de novo de promotores supresores de tumores susceptibles[37].

Es probable que haya también bucles retroactivos entre los miARN y las enzimas epigenéticas que controlan si uno de los componentes del

sendero de la senda se desregula. Esto reforzará los mecanismos de control anómalos de la célula, lo que lleva a otro ciclo vicioso que se muestra en la figura 11.4. En este ejemplo, un miARN regula una enzima epigenética específica que modifica al promotor del miARN. En este caso, la enzima epigenética crea una modificación represiva.

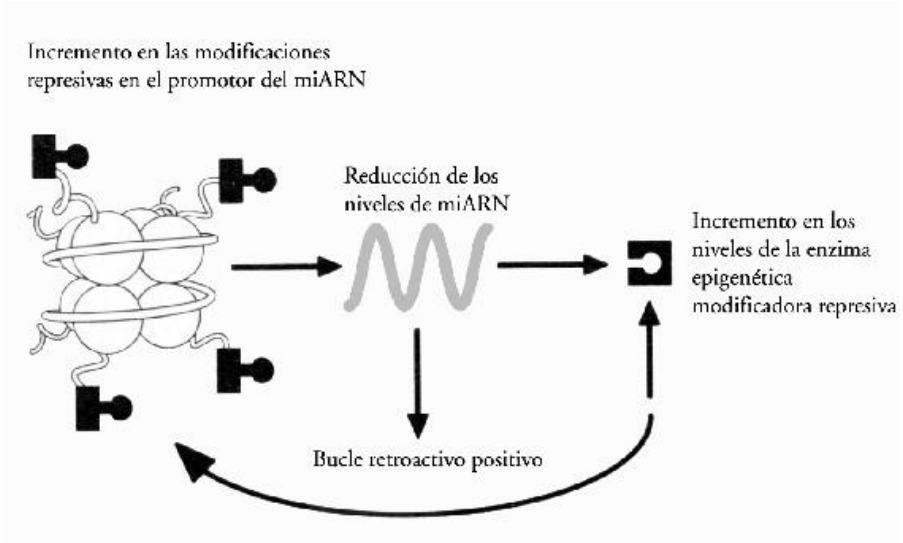

Figura 11.4: Un bucle retroactivo positivo que constantemente redujese la expresión de un miARN controlaría normalmente la expresión de una enzima epigenética que crea un estado reprimido de la cromatina.

Es mucho todavía lo que necesitamos entender si hemos de desarrollar una nueva generación de drogas epigenéticas para el tratamiento del cáncer. Necesitamos saber qué drogas funcionarán mejor en cada enfermedad y qué pacientes saldrán más beneficiados. Queremos ser capaces de calcular esto por adelantado, de modo que no tengamos que esperar que la suerte nos acompañe cuando llevemos a cabo un gran número de ensayos clínicos. Al menos la 5-azacitidina y el SAHA nos han servido para saber que la terapia epigenética es posible en el cáncer, aunque necesita mejorar.

Como veremos en el siguiente capítulo, los problemas epigenéticos no se limitan al cáncer. Pero lamentablemente estamos aún más lejos de saber cómo utilizar terapias epigenéticas en una de las mayores necesidades clínicas no resueltas del mundo occidental –las enfermedades psiquiátricas.

1. Karon et al. (1973), Blood 42: 359-65.
2. Constantinides et al. (1977), Nature 267: 364-366.
3. Taylor y Jones (1979), Cell 17: 771-779.
4. Jones (2011), Nature Cell Biology 13: 2.
5. Jones and Taylor (1980), Cell 20: 85-93.
6. Santi et al. (1983), Cell 33: 9-10.
7. Ghoshal et al. (2005), Molecular and Cellular Biology 25: 4.727-4.741.
8. Kuo et al. (2007), Cancer Research 67: 8.248-8.254.
9. Para una excelente historia del desarrollo del SAHA, véase Marks and Breslow (2007), Nature Biotechnology 25: 84-90.

10. Friend et al. (1971), Proc Nat Acad Sci. USA 68: 378-382.
11. Richon et al. (1996), Proc Nat Acad Sci. USA 93: 5.705-5.708.
12. Yoshida et al. (1990), Journal of Biological Chemistry 265: 17.174-17.179.
13. Richon et al. (1998), Proc Nat Acad Sci. USA 95: 3.003-3.007.
14. Herman et al. (1994), Proc Nat Acad Sci. USA 91: 9.700-9.704.
15. Esteller et al. (2000), Journal of the National Cancer Institute 92: 564-569.
16. Toyota et al. (1999), Proc Nat Acad Sci. USA 96: 8.681-8.686.
17. Lu et al. (2006), Oncogene 25: 230-9.
18. Gery et al. (2007), Clin Cancer Res. 13: 1.399-404.
19. Para una reseña reciente de un trastorno en el que la terapia génica está demostrando ser muy eficaz, véase Ferrua et al. (2010), Curr Opin Allerg Clin Immunol. 10: 551-6.
20. Kantarjian et al. (2006), Cancer 106: 1.794-1.803.
21. Silverman et al. (2002), J Clin Oncol. 20: 2.429-2.440.
22. Duvic et al. (2007), Blood 109: 31-39.
23. www.cancer.gov/clinicaltrials/search/results?protocolsearchid=8828355
24. www.lifesciencvesworld.cpom/news/view/11080
25. http://www.masshightech.com/stories/2008/04/21/story1-Epigenetics-is-the-word-on-bio-investors-lips.htiml
26. Viré et al. (2006), Nature 439: 871-874.
27. Schlesinger et al. (2007), Nature Genetics 39: 232-236.
28. Shi et al. (2004), Cell 29: 119; 941-53.
29. Ooi et al. (2007), Nature 448: 714-717.
30. Bachmann et al. (2006), J Clin Oncology 24: 268-273.
31. Lim et al. (2010), Carcinogenesis 31: 512-20.
32. Kondo et al. (2008), Nature Genetics 40: 741-750.
33. Widschwendter et al. (2007), Nature Genetics 39: 157-158.
34. Taby and Issa (2010), CA Cancer J Clin. 60: 376-92.
35. Bernstein et al. (2006), Cell 125: 315-326.
36. Ohm et al. (2007), Nature Genetics 39: 237-42.
37. Fabbri et al. (2007), Proc Nat Acad Sci. USA 104: 15.805-10.

Capítulo 12
Todo está en la mente

La mente es su propio lugar y por sí misma puede hacer del
Cielo un Infierno y del Infierno un Cielo.
John Milton

Una de las modas literarias más perceptibles de los últimos diez años ha sido el de las llamadas "autobiografías del sufrimiento". En dicho género, los autores cuentan las dificultades vividas durante su infancia y cómo han llegado a superarlas para poder vivir y realizarse como individuos. El género puede subdividirse en dos categorías. La primera es la del relato "éramos pobres pero felices", la historia "carecíamos de todo pero nos amábamos". La segunda, que puede o no incluir también este elemento de la pobreza, tiende a ser mucho más perturbadora. Consiste en el relato de unas historias desgarradoras de abandono y abuso infantil, y algunos de estos relatos han sido éxitos de venta. A Child Called "It", de David Pelzer, posiblemente el más famoso de esta categoría de libros, estuvo más de seis años en la lista de libros más vendidos del New York Times.

Una parte sustancial del atractivo de estos libros autobiográficos parece estar en el aspecto del triunfo sobre la adversidad que describen. Los lectores parecen encontrar muy alentadoras estas historias de individuos que, pese a haber tenido un comienzo terrible en la vida, acaban finalmente siendo personas felices y equilibradas. Nos complace asistir a la victoria de estas personas que han salido victoriosaos "contra pronóstico".

Esto nos dice algo muy revelador. Nos dice que, como sociedad, creemos que las experiencias de la primera infancia tienen una influencia enorme en la vida adulta. También pone de manifiesto que creemos que es muy difícil superar los efectos de un trauma temprano. Como lectores, es posible que valoremos a estos exitosos supervivientes debido a que los percibimos como personas relativamente excepcionales.

En muchos sentidos estamos en lo cierto al suponer que las más terribles experiencias de la infancia tienen un efecto realmente dramático en la vida adulta. Esto se ha medido de formas muy diversas y las cifras exactas pueden variar según el estudio de que se trate. Pese a ello, hay unas cuantas cosas que emergen claramente de

todos los estudios. El abandono y el abuso durante la infancia crea adultos con una probabilidad tres veces mayor de cometer suicidio que la población en general. Los niños que han sufrido malos tratos tienen un 50 por ciento más de probabilidades que la población en general de tener graves depresiones en su vida adulta, y tienen muchas más dificultades que los demás para recuperarse de esta enfermedad. Los adultos que de niños fueron abandonados o sometidos a malos tratos tienen un riesgo mucho más elevado de sufrir una serie de enfermedades como esquizofrenia, anorexia o bulimia, trastornos de la personalidad, trastorno bipolar o ansiedad generalizada. También es mucho más probable que caigan en el alcoholismo o la drogadicción[1].

Un entorno de negligencia o malos tratos durante la juventud es claramente un factor de riesgo en el desarrollo posterior de trastornos neuropsiquiátricos. Tenemos esto tan asumido como sociedad que a veces incluso nos olvidamos de preguntar por qué tiene que ser así. Es algo que parece obvio. Pero no lo es. ¿Por qué algo que ha durado unos dos años, por ejemplo, tiene que tener consecuencias para el individuo que lo ha vivido hasta muchas décadas después?

Una explicación que se da a menudo es la de que los niños resultan "psicológicamente dañados" por sus primeras experiencias vitales. Aunque esto sea cierto, no es precisamente muy clarificador. Y el motivo de que no lo sea es que la expresión "psicológicamente dañados" no es en absoluto una explicación; es una simple descripción. Parece convincente pero a determinados niveles no nos dice realmente nada.

Cualquier científico que aborde este problema querrá partir de esta descripción y sondearla a otro nivel. ¿Cuáles son los fenómenos moleculares subyacentes a este daño psicológico? ¿Qué es lo que sucede en el cerebro de los niños sometidos a malos tratos que los hace propensos a tener problemas de salud mental como adultos?

A veces se dan resistencias a este enfoque desde disciplinas que trabajan con un marco conceptual diferente. Esto es bastante desconcertante. Si no aceptamos que hay una base molecular en un efecto biológico, ¿qué nos queda? Una persona religiosa puede preferir invocar el alma, del mismo modo que un terapeuta freudiano invoca la psique. Pero ambos se refieren a un constructo teórico que no tiene una base física definida. Instalarse en un sistema teórico en el que es imposible desarrollar las hipótesis verificables que son la piedra angular de toda investigación científica es algo muy poco atractivo para cualquier científico. Preferimos optar por un mecanismo que tenga un fundamento físico en vez de situarnos por defecto en un escenario en el que se da por supuesto que algo, de algún modo, es una parte de nosotros pese a no tener ningún tipo de existencia física.

Esto puede producir un conflicto cultural, pero será un conflicto basado en un malentendido. Un científico esperará que un fenómeno observable tenga una base física. Por lo que respecta al tema de este capítulo, la hipótesis que proponemos es que las experiencias terribles de la primera infancia cambian determinados aspectos físicos del cerebro durante un período que es clave para el desarrollo. Esto a su vez tiene consecuencias en la probabilidad de desarrollar problemas de salud mental durante la vida adulta. Esta es una explicación mecanicista. No le sobran detalles, lo admito, pero en este mismo capítulo veremos algunos de estos detalles. Las explicaciones mecanicistas a menudo provocan inquietud en nuestra sociedad porque parecen excesivamente deterministas. Las explicaciones mecanicistas son malinterpretadas y se interpretan como si implicasen que los seres humanos son esencialmente robots, cableados y programados para responder de determinada manera a determinados estímulos.

Pero esto no tiene por qué ser verdad. Si un sistema tiene suficiente flexibilidad, un mismo estímulo no tiene por qué tener necesariamente un solo resultado. No todo niño abandonado o sometido a malos tratos se convierte en un adulto vulnerable e infeliz. Un fenómeno puede tener una base mecanicista sin ser determinista.

El cerebro humano posee suficiente flexibilidad para generar diferentes resultados en un adulto en respuesta a experiencias infantiles similares. Nuestros cerebros contienen unos cien mil millones de células nerviosas (neuronas). Cada neurona conecta con otras diez mil neuronas formando una increíble rejilla tridimensional. Esta rejilla contiene, por tanto, 1.000.000.000.000.000 (mil billones) de conexiones. Es difícil imaginar esto, pero si visualizamos cada conexión como si fuera un disco de 1 mm de espesor y colocáramos estos mil billones de discos unos encima de otros, podríamos organizar hasta tres columnas que llegaran hasta el Sol (que se encuentra a 150 millones de kilómetros de la Tierra) y volvieran a la Tierra hasta tres veces.

Esto son muchas conexiones, por lo que es perfectamente posible imaginar que nuestros cerebros tienen mucha flexibilidad. Pero las conexiones no son aleatorias. Hay redes de células dentro de esta gigantesca rejilla que tienen tendencia a conectarse unas con otras más que con otras redes. Es esta combinación de una gran flexibilidad y su circunscripción dentro de ciertas configuraciones lo que hace a nuestros cerebros compatibles con un sistema que es mecanicista pero no totalmente determinista.

El niño es (epigenéticamente) padre del hombre

La razón de que los científicos hayamos planteado la hipótesis de que las secuelas adultas de los malos tratos durante la infancia puedan tener un componente epigenético es que nos encontramos en unos escenarios en los que un acontecimiento desencadenante de otros sigue teniendo consecuencias mucho tiempo después de que el propio desencadenante ha desaparecido. Las consecuencias a largo plazo de los traumas infantiles recuerdan muchos de los efectos mediados por los sistemas epigenéticos. Ya hemos visto algunos ejemplos de esto. Las células diferenciadas recuerdan qué tipo de células son, incluso mucho tiempo después de que la señal que les dijo que tenían que convertirse en células renales o en células de la piel ha desaparecido. Audrey Hepburn tuvo mala salud toda su vida debido a la desnutrición que sufrió siendo una adolescente durante la Hambruna Invernal Holandesa. Los genes con impronta se desactivan en determinadas fases del desarrollo, y siguen desactivados toda la vida. De hecho, las modificaciones epigenéticas son el único mecanismo conocido para mantener a las células en un estado particular durante largos períodos de tiempo.

La hipótesis que los epigenetistas están comprobando es si los traumas infantiles causan una alteración en la expresión de los genes en el cerebro, generada o mantenida (o ambas cosas) por mecanismos epigenéticos. Estas anomalías epigenéticamente mediadas en la expresión de los genes predisponen a los adultos a tener un riesgo más elevado de enfermedades mentales.

Recientemente, los científicos han empezado a generar datos que sugieren que esto es algo más que una hipótesis atractiva. Las proteínas epigenéticas desempeñan un papel importante en la programación de los efectos de los traumas infantiles. Y no solo esto, también están involucradas en la depresión adulta, en la drogadicción y en la memoria “normal”.

El centro de buena parte de la investigación en este campo ha sido una hormona llamada cortisol. Esta hormona la producen las glándulas suprarrenales, situadas, como su nombre indica, encima de los riñones. El cortisol se produce en respuesta al estrés. Cuanto más estresados estamos, más cortisol producimos. El nivel medio de producción de cortisol tiende a ser más elevado en adultos que han tenido infancias traumáticas, aunque el individuo esté sano en el momento de efectuar la medición[2, 3]. Lo que esto pone de manifiesto es que los adultos que han sufrido abandono o malos tratos en su infancia tienen unos niveles de estrés contextual superiores a los de sus contemporáneos. Sus organismos están crónicamente estresados. El desarrollo de enfermedades mentales es, en muchos casos, probablemente un poco como el desarrollo del cáncer. Muchas cosas

tienen que ir mal a nivel molecular para que una persona enferme clínicamente. Los niveles de estrés crónico en los supervivientes de abusos los llevan más cerca de este umbral. Esto aumenta su vulnerabilidad a la enfermedad.

¿Cómo se produce esta sobre-expresión del cortisol? Es una consecuencia de acontecimientos que tienen lugar lejos de los riñones, en el cerebro. En este caso está involucrada una auténtica cascada de señales. Las sustancias químicas producidas en una región del cerebro actúan en otras áreas. Estas áreas, a su vez, producen sustancias químicas a modo de respuesta y el proceso continúa. Eventualmente, la sustancia sale del cerebro para dirigir la señal a las glándulas suprarrenales y se produce cortisol. Durante una infancia de malos tratos, esta cascada de señales está muy activa. En muchos supervivientes de abusos, el sistema sigue emitiendo señales como si la persona implicada estuviese todavía atrapada en la situación abusiva. Es como si el termostato de un sistema de calefacción estuviese estropeado y la caldera y los radiadores continuasen emitiendo calor en pleno mes de agosto, basándose en la temperatura del mes de febrero.

El proceso empieza en una región del cerebro llamada hipocampo, que recibe su nombre del antiguo término griego que significa “caballito de mar”, porque tiene una forma muy parecida a la de esta criatura. El hipocampo actúa como una especie de interruptor que controla hasta qué punto se activa el sistema productor de coretisol. Esto se muestra en la figura 12.1. En ella, el símbolo + indica que un acontecimiento activa otro acontecimiento de la cadena. Y el símbolo – muestra el efecto contrario, en el que un acontecimiento reduce el nivel de actividad del siguiente acontecimiento de la cadena.

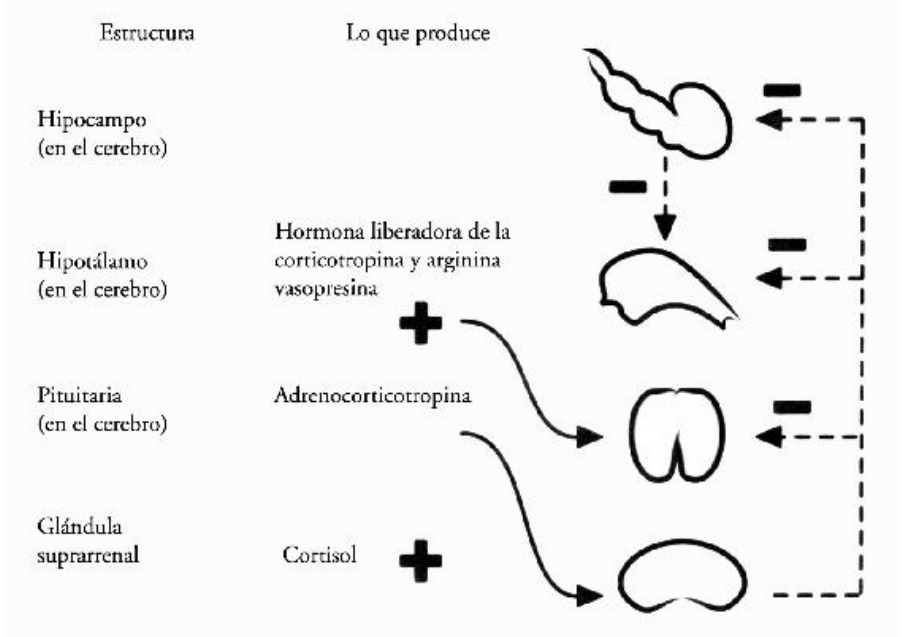

Figura 12.1: Una serie de señales en respuesta al estrés provocan una cascada de acontecimientos en determinadas regiones del cerebro que eventualmente tienen como consecuencia la liberación de la hormona del estrés, el cortisol, por las glándulas suprarrenales. En circunstancias normales, este sistema es controlado por un conjunto de bucles retroactivos negativos que actúan para reducir y limitar la activación de los senderos de respuesta al estrés.

Debido a los cambios en la actividad del hipocampo en respuesta al estrés, el hipotálamo produce y libera dos hormonas, la hormona liberadora de la corticotropina y la arginina vasopresina. Estas dos hormonas estimulan a la glándula pituitaria, que responde liberando una sustancia llamada adrenocorticotropina que pasa a la sangre. Cuando las células de la glándula suprarrenal absorben esta hormona, liberan cortisol.

Hay un ingenioso mecanismo implícito en este sistema. El cortisol circula por todo el cuerpo en el torrente sanguíneo y vuelve al cerebro. Las tres estructuras cerebrales que se muestran en el diagrama llevan receptores que reconocen el cortisol. Cuando el cortisol se une a estos receptores crea una señal que dice a estas estructuras que se calmen. Es muy importante que esto suceda en el hipocampo, pues esta estructura puede enviar señales para reducir la actividad de todas las demás estructuras involucradas en este sistema de señales. Este es un clásico bucle retroactivo negativo. La producción de cortisol realimenta a varios tejidos y el efecto final es que la producción de cortisol decrece. Esto impide que estemos constantemente estresados.

Pero sabemos que los adultos que han tenido infancias traumáticas

están realmente estresados. Producen constantemente un exceso de cortisol. Algo debe de funcionar mal en este bucle. Hay unos cuantos estudios en humanos que muestran que este es el caso. Estos estudios examinaron los niveles de la hormona liberadora de corticotropina en el fluido que baña el cerebro y la médula espinal. Como se había previsto, los niveles de la hormona liberadora de corticotropina eran más elevados en aquellos individuos que habían sufrido abusos durante la infancia. Esto era cierto incluso cuando los individuos estaban sanos en el momento de efectuar los experimentos[4, 5]. Dada la dificultad de investigar estas cosas en los humanos, muchos de los avances realizados en este campo se han obtenido utilizando modelos animales de determinadas condiciones y relacionándolas en la medida de lo posible con lo que sabemos de los casos humanos.

Ratas tranquilas y ratones apacibles

Un modelo útil ha sido el basado en las habilidades de las ratas en la aplicación de cuidados maternos. Durante sus primeras semanas de vida, a las crías de rata les encanta ser lamidas y acicaladas por sus madres. Algunas madres son naturalmente buenas en este aspecto, otras no tanto. Si una madre es buena en este sentido, lo es con todas sus camadas. Y del mismo modo, si una madre es un tanto displicente cuidando a sus crías, lo es también con todas sus camadas.

Si estudiamos a las crías de estas diferentes madres cuando ya son animales adultos e independientes, emerge un aspecto interesante. Cuando sometemos a estas ratas ahora adultas a una situación levemente estresante, las que fueron más lamidas y acicaladas se quedan bastante tranquilas. Las que se vieron relativamente privadas de "amor maternal" reaccionan de una forma más exagerada incluso a un estrés leve. Esencialmente, las ratas que habían sido más lamidas y acicaladas cuando eran crías son las más tranquilas de adultas.

Los investigadores realizaron experimentos en los que las ratas fueron transferidas de madres "buenas" a madres "malas" y viceversa. Estos experimentos mostraron que las respuestas finales de los adultos se debían completamente al amor y al afecto que habían recibido durante la primera semana de su vida. Las crías nacidas de madres que eran lamedoras mediocres crecían normalmente muy tranquilas si eran adoptadas por madres que sí tenían esta habilidad.

Los bajos niveles de estrés de las ratas adultas que habían sido perfectamente cuidadas siendo crías se ponían de manifiesto midiendo su conducta cuando eran sometidas a estímulos leves. También eran controladas hormonalmente, y los efectos fueron los esperados. Las

ratas más tranquilas tenían unos niveles inferiores de hormona liberadora de la corticotropina en el hipotálamo y niveles inferiores de adrenocorticotropina en la sangre. Sus niveles de cortisol eran también bajos comparados con los de los animales menos cuidados.

El factor molecular clave a la hora de reducir la respuesta al estrés en las ratas bien cuidadas era la expresión del receptor del cortisol en el hipocampo. En estas ratas, el receptor se expresaba mucho, y en consecuencia las células del hipocampo eran muy eficientes a la hora de captar niveles incluso muy bajos de cortisol y utilizarlos como desencadenante para atenuar la actividad hormonal por medio de un bucle retroactivo negativo.

Esto puso de manifiesto que los niveles del receptor cortisol en el hipocampo seguían siendo altos mucho tiempo después que las crías hubiesen sido lamidas y acicaladas por sus madres. Esencialmente, unos hechos que habían tenido lugar solo durante los siete días inmediatamente posteriores al nacimiento de las ratas tenían consecuencias que duraban casi toda la vida de estas.

La razón de que las consecuencias fuesen tan duraderas fue que el estímulo inicial –el hecho de ser lamidas y acicaladas por la madre– había puesto en marcha una cadena de acontecimientos que llevó a unos cambios epigenéticos en el gen del receptor del cortisol. Estos cambios se produjeron muy pronto en el desarrollo, cuando el cerebro era más "plástico". Cuando digo "plástico" me refiero a que es en este momento cuando es más fácil modificar los patrones de expresión del gen y las actividades celulares. Cuando el animal se va haciendo mayor, estos patrones siguen vigentes. Es por esto que la primera semana de la vida de las ratas es tan crítica.

Los cambios que tienen lugar se muestran en la figura 12.2. Cuando una cría de rata es muy lamida y acicalada produce serotonina, una de las sustancias químicas que producen placer en el cerebro de los mamíferos. Esto estimula la expresión de las enzimas epigenéticas en el hipocampo, lo que en última instancia resulta en una menor metilación del ADN del gen receptor del cortisol. Los bajos niveles de metilación del ADN están asociados a niveles elevados de expresión del gen. Por consiguiente, el receptor del cortisol se expresa a altos niveles en el hipocampo y hace que las ratas se mantengan relativamente tranquilas[6].

Este es un modelo muy interesante para explicar cómo los acontecimientos de los primeros días de una vida pueden influir en la conducta a largo plazo. Pero parece poco probable que una sola alteración epigenética –incluso una tan significativa como los niveles de metilación del ADN en un gen muy importante en una región crítica del cerebro– pueda ser la única respuesta. Cinco años después del trabajo citado más arriba, otro grupo de investigadores publicó un

nuevo trabajo en el que también se mostraba la importancia de los cambios epigenéticos, pero en un gen diferente.

El último grupo de investigadores utilizó un modelo de ratón del estrés en los primeros días de vida. En este modelo, las crías de rata eran apartadas de sus madres durante tres horas al día durante los diez primeros días de su vida. Del mismo modo que las crías que habían sido poco lamidas y acicaladas, estas crías se convirtieron en adultos estresados. Los niveles de cortisol eran muy elevados en estos ratones, especialmente en respuesta a un estrés leve, igual que las ratas relativamente mal cuidadas.

Los investigadores que trabajaban con estos ratones y estas ratas estudiaron el gen de la arginina vasopresina. La arginina vasopresina la secreta el hipotálamo y estimula la secreción de la glándula pituitaria. Esto se muestra en la Figura 12.1. Los ratones estresados, aquellos que habían sido separados de sus madres al principio de sus vidas, tenían unos niveles menores de metilación del ADN en el gen de la arginina vasopresina. Esto tuvo como consecuencia un aumento en la producción de arginina vasopresina que estimuló la respuesta al estrés[7].

Los estudios experimentales con ratas y ratones nos enseñaron dos cosas importantes. La primera es que cuando los acontecimientos de los primeros días de vida producen estrés en el adulto, probablemente hay más de un gen implicado. Tanto el gen receptor del cortisol como el gen de la arginina vasopresina pueden contribuir a este fenotipo en los roedores.

En segundo lugar los estudios también nos mostraron que una clase particular de modificación epigenética no es en sí misma buena o mala. Lo que importa es el lugar en el que se produce la modificación. En el modelo de las ratas, la reducción en la metilación del ADN del gen recpetor del cortisol tiene efectos “positivos”. Lleva a un aumento en la producción de este receptor y a una suavización general de la respuesta del estrés. En el modelo de los ratones, la reducción en la metilación del ADN del gen de la arginina vasopresina tiene efectos “negativos”. Lleva a un incremento en la expresión de esta hormona y a una estimulación de la respuesta al estrés.

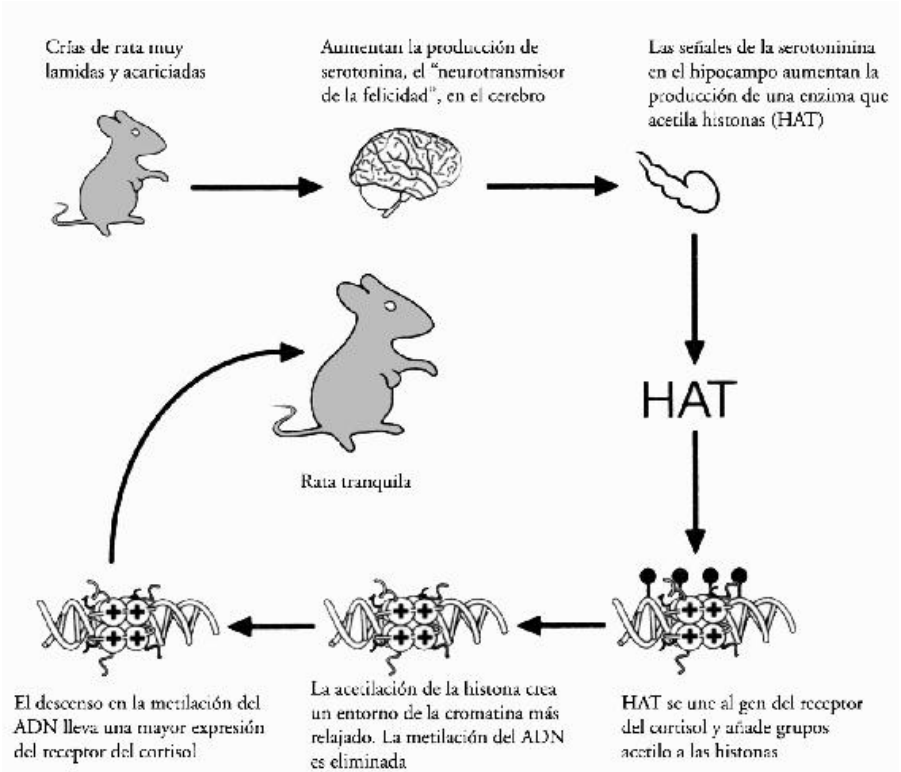

Figura 12.2: El cuidado intenso de las crías de una camada de ratones provoca una cascada de acontecimientos moleculares que tienen como resultado un aumento en la expresión del receptor del cortisol en el cerebro. Este aumento hace que el cerebro sea muy efectivo a la hora de responder al cortisol y de regular a la baja las respuestas al estrés mediante el bucle retroactivo negativo descrito en la Figura 12.1.

La reducción de la metilación del ADN del gen de la arginina vasopresina en el modelo del ratón se produjo por un camino diferente del utilizado en el hipocampo de la rata para activar al gen receptor del cortisol.

En los estudios con ratones, la separación de la madre activaba las neuronas del hipotálamo. Esto iniciaba una cascada de señales que afectaba a la proteína MeCP2. MeCP2 es la proteína que encontramos en el capítulo 4, que se liga al ADN metilado y contribuye a reprimir la expresión del gen. También es el gen el que sufre una mutación en el devastador trastorno neurológico conocido como síndrome de Rett. Adrian Bird ha puesto de manifiesto que la proteína MeCP2 se expresa de manera increíblemente elevada en las neuronas[8].

Normalmente, la proteína MeCP2 se une al ADN metilado en el gen de la arginina vasopresina. Pero en las crías de rata estresadas, la cascada de señales mencionada en el párrafo anterior añade un pequeño grupo químico llamado fosfato a la proteína MeCP2, y debido a esto MeCP2 se desprende del gen de la arginina vasopresina. Uno de

los roles importantes de MeCP2 es atraer a otras proteínas epigenéticas al lugar en el que está ligada a un gen. Estas son proteínas que contribuyen a añadir más y más marcas represivas a esta región del genoma. Cuando la MeCP2 fosforilada se desprende del gen de la arginina vasopresina, ya no puede reclutar estas diferentes proteínas epigenéticas. Debido a ello, la cromatina pierde sus marcas represivas. En cambio se activan determinadas modificaciones, como unos niveles elevados de acetilación de las histonas. En última instancia, incluso la metilación del ADN se pierde de modo permanente.

Increíblemente, en las ratas todo esto sucede en los diez primeros días después del nacimiento. Después de ello, las neuronas pierden esencialmente su plasticidad. El patrón de metilación del ADN vigente al final de esta fase se convierte en el patrón estable en este lugar. Si los niveles de metilación del ADN son bajos, esto estará normalmente asociado con una expresión anormalmente elevada del gen de la arginina vasopresina. De este modo, los acontecimientos del principio de la vida provocan unos cambios epigenéticos que quedan efectivamente “atascados”. Debido a ello, el animal sigue estando muy estresado, con una producción anormal de hormonas, mucho después de que haya desaparecido el estrés inicial. Efectivamente, la respuesta continúua mucho tiempo después de que el animal haya dejado incluso de “preocuparse” por si tiene o no la compañía de su madre. Al fin y al cabo, las ratas no son conocidas precisamente por quedarse en casa a cuidar de sus padres cuando estos envejecen.

En las profundidades

Los investigadores están reuniendo gradualmente datos que sugieren que algunos de los cambios vistos en los modelos de roedores del estrés temprano pueden ser relevantes en los humanos. Como ya hemos dicho antes, hay cuestiones logísticas, y sobre todo éticas, que hacen imposible realizar el mismo tipo de estudios en personas. Incluso teniendo esto en cuenta, pueden establecerse algunas correlaciones interesantes.

El trabajo original con el modelo de ratas lo llevó a cabo un equipo dirigido por el profesor Michael Meaney en la McGill University de Montreal. Posteriormente, este mismo grupo realizó unos interesantes estudios en muestras de cerebros humanos de individuos que habían cometido suicidio. Los investigadores analizaron los niveles de metilación del ADN en el gen receptor del cortisol en el hipocampo de estos casos. Sus datos pusieron de manifiesto que la metilación del

ADN tendía a ser mayor en las muestras de aquellas personas que tenían un historial de abuso o malos tratos en la infancia. En cambio, los niveles de metilación del ADN en este gen eran relativamente bajos en las víctimas de suicidio que no habían tenido infancias traumáticas[9]. Los altos niveles de metilación del ADN en las víctimas de abusos reducirían la expresión del gen del receptor del cortisol. Esto haría menos eficientes los bucles negativos retroactivos y elevaría los niveles de circulación del cortisol. Esto era consistente con los descubrimientos hechos en otros estudios con ratas en los que los animales estresados con madres menos cariñosas tenían unos niveles superiores de metilación del ADN en el gen receptor del cortisol en el hipocampo.

Naturalmente, no son solo las personas que han sufrido abusos en su infancia las que desarrollan enfermedades mentales. Las cifras globales de la depresión son alarmantes. La Organización Mundial de la Salud estima que unos 120 millones de personas en todo el mundo sufren depresión. Los suicidios relacionados con la depresión han llegado a la cifra de 850.000 al año, y la predicción es que antes del año 2020 la depresión se convertirá en el segundo factor entre las causas de este problema global[10].

El tratamiento efectivo de la depresión dio un gran paso adelante a comienzos de los años 1990 con la autorización por parte de la Food and Drug Administration en EEUU de un tipo de drogas llamado SSRI, por las siglas en inglés de selective serotonin re-uptake inhibitors [inhibidores selectivos de la recaptación de la serotonina]. La serotonina es un neurotransmisor, una molécula que transmite señales entre neuronas. La serotonina se libera en el cerebro en respuesta a estímulos placenteros; es la molécula de la felicidad que encontramos en las crías de ratones. Los niveles de serotonina son bajos en los cerebros de las personas que sufren depresión. Las drogas SSRI aumentan los niveles de serotonina en el cerebro.

Parece lógico que las drogas que provocan un aumento en los niveles de serotonina sean útiles en el tratamiento de la depresión. Pero hay algo extraño en su acción. Los niveles de serotonina en el cerebro suben muy rápidamente cuando los pacientes son tratados con drogas SSRI. Pero pasan entre cuatro y seis semanas antes de que los terribles síntomas de la depresión severa empiecen a remitir.

Esto da a entender que en la depresión hay algo más que una caída en los niveles de una sola sustancia química en el cerebro, lo que tal vez no sea tan sorprendente. Es poco habitual que una depresión aparezca de la noche a la mañana; no es como coger la gripe. Disponemos actualmente de una cantidad razonable de datos que indican que a medida que se desarrolla una depresión se producen unos cambios mucho más duraderos en el cerebro. Esto incluye

alteraciones en el número de contactos que establecen entre sí las neuronas. Y esto a su vez depende críticamente de los niveles de unas sustancias químicas llamadas neurotrópicos[11]. Estas sustancias químicas contribuyen a la función y a la salud de las células del cerebro.

Los investigadores que trabajan en el campo de la depresión han pasado de un modelo simple basado en los niveles de los neurotransmisores a un modelo más complejo en forma de red. Esto implica una serie de sofisticadas interacciones entre la actividad neuronal y toda una gama de otros factores. Esto incluye el estrés, la producción de neurotransmisores, efectos en la expresión de los genes y consecuencias a largo plazo para las neuronas y para la forma que interactúan unas con otras. Cuando este sistema está en equilibrio el cerebro funciona normalmente. Si el sistema se desequilibra, esta complicada red empieza a deshacerse. Esto aleja a la bioquímica y a la función del cerebro de la salud y las acerca a la disfunción y a la enfermedad.

Los científicos están empezando a centrar su atención en este campo en la epigenética, debido a su potencial para crear y mantener patrones duraderos de expresión de los genes. Los roedores son el sistema modelo más habitual en este tipo de investigaciones. Y ya que una rata o un ratón no pueden explicar cómo se sienten, los investigadores han creado unos tests conductuales que utilizan para modelar diferentes aspectos de la depresión humana.

Todos sabemos que diferentes personas parecen responder al estrés de maneras diferentes. Algunas personas parecen ser muy fuertes. Otras pueden reaccionar muy mal a la misma situación estresante, incluso desarrollando una depresión. Lo mismo puede decirse de ratones de diferentes variedades endogámicas. Los investigadores expusieron a dos variedades de ratones diferentes a unos estímulos ligeramente estresantes. Una vez pasada la situación estresante, los investigadores evaluaron el comportamiento de los ratones en algunas de las pruebas que remedan determinados aspectos de la depresión humana. Una de las variedades se mostró relativamente menos ansiosa que la otra. Estas variedades recibieron el nombre de B6 y BALB, respectivamente, pero nosotros vamos a referirnos a ellas, por comodidad, llamándolas variedad “tranquila” y variedad “nerviosa”.

Los investigadores centraron sus estudios en una región del cerebro llamada el nucleus accumbens. Esta región desempeña un papel en varias funciones cerebrales emocionalmente importantes. Entre ellas se incluyen la agresión, el miedo, el placer y la recompensa. Los investigadores analizaron la expresión de varios factores neurotrópicos en el nucleus accumbens. El que produjo unos resultados más interesantes fue un gen llamado Gdnf (por las siglas en inglés de glial

cell-derived neurotropic factor [factor neurotrópico derivado de la línea celular glial]).

El estrés provocó un incremento en la expresión del gen Gdnf en los ratones tranquilos. En los ratones nerviosos provocó una reducción en la expresión del mismo gen. Ahora bien, diferentes variedades endogámicas de ratones pueden tener códigos de ADN diferentes, y los investigadores analizaron la región promotora que controla la expresión del gen Gdnf. La secuencia de ADN del promotor de Gdnf era idéntica en los ratones tranquilos y en los nerviosos. Pero cuando los científicos examinaron las modificaciones epigenéticas en este promotor, encontraron una diferencia. Las histonas de los ratones nerviosos tenían menos grupos acetilo que las histonas de los ratones tranquilos. Como ya hemos visto, unos niveles bajos de acetilación de las histonas están asociados con unos niveles bajos de expresión de un gen, de modo que esto ligaba perfectamente con el descenso en la expresión de Gdnf en los ratones nerviosos.

Esto llevó a los científicos a preguntarse qué les había sucedido a las neuronas del nucleus accumbens. ¿Por qué los niveles de acetilación de las histonas habían caído en el gen Gdnf de los ratones nerviosos? Los científicos examinaron los niveles de las enzimas que añaden o quitan grupos acetilo de las histonas. Encontraron solamente una diferencia entre las dos variedades de ratones. Una deacetilasa de histona específica (miembro de la clase de proteínas que quita grupos acetilo) llamada Hdac2 se expresaba mucho más en las neuronas de los ratones nerviosos[12], comparados con los ratones tranquilos.

Otros investigadores pusieron a prueba a varios ratones en un modelo diferente de depresión llamado modelo de la “derrota social”. En estos experimentos, los ratones son básicamente humillados. Se les coloca en un entorno en el que no pueden escapar de un ratón más grande y agresivo, aunque son retirados antes de que lleguen a sufrir un daño físico. Algunos ratones encontraron esta situación muy estresante; otros parecieron no inmutarse.

En los experimentos, unos ratones adultos experimentaron diez días de derrota social, y al final de este período fueron clasificados como susceptibles o como resistentes, en función de lo bien que se recuperaban de la experiencia. Dos semanas más tarde se examinó de nuevo a los ratones. Los ratones resistentes tenían unos niveles normales de la hormona liberadora de la corticotropina. Esta es la sustancia química liberada por el hipotálamo. Es la que en última instancia estimula la producción de cortisol, la hormona del estrés. Los ratones susceptibles tenían niveles elevados de la hormona liberadora de la corticotropina y niveles bajos de metilación del ADN en el promotor de este gen. Esto era consistente con los elevados niveles de expresión del gen. También tenían bajos niveles de Hdac2, y niveles

elevados de acetilación de las histonas, lo que una vez más encaja con la sobre-expresión de la hormona liberadora de la corticotropina[13].

Podría parecer extraño que en un sistema modelo los niveles de Hdac2 suban en los ratones susceptibles, mientras que en otro modelo bajen. Pero en todos estos fenómenos epigenéticos es importante recordar que el contexto es fundamental. No hay una sola forma de controlar los niveles de Hdac2 (o los de cualquier otro gen epigenético, para el caso). El control dependerá de la región del cerebro y de la configuración precisa de la cascada de señales que se activen en respuesta a un estímulo.

Las drogas funcionan

Hay más pruebas que respaldan el importante papel que tiene la epigenética en las respuestas al estrés. Los ratones naturalmente nerviosos de la variedad B6 eran los que tenían un aumento de la expresión de Hdac2 en el nucleus accumbens, y una reducción en la expresión del gen Gdnf. Es posible tratar a estos ratones con SAHA, un inhibidor de las deacetilasas de histona. El tratamiento con SAHA lleva a una mayor acetilación del promotor del Gdnf. Esto se asocia con una mayor expresión de este gen. El descubrimiento crucial fue que los ratones tratados dejan de estar nerviosos y se tranquilizan[14] –el cambio en los niveles de acetilación de las histonas del gen altera la conducta de los ratones. Esto respalda la idea de que la acetilación de la histona es realmente importante para modular las respuestas que dan estos ratones al estrés.

Una de las pruebas utilizadas para investigar el grado de depresión de los ratones en respuesta al estrés se conoce como el test de la preferencia por la sacarosa. A los ratones felices normales les encanta el agua azucarada, pero cuando se deprimen no están tan interesados en ella. Esta respuesta reducida a un estímulo agradable se denomina anhedonia, y al parecer es uno de los mejores marcadores-sustituto de la depresión humana en animales[15]. La mayor parte de las personas con una depresión severa manifiestan haber perdido el interés en todo aquello que les hacía la vida agradable antes de enfermar. Cuando los ratones estresados fueron tratados con antidepresivos SSRI, su interés por el agua azucarada aumentó gradualmente. Pero cuando fueron tratados con SAHA, el inhibidor de las HDAC, recuperaron mucho más rápidamente el interés por su bebida favorita[16].

No es solo en los ratones tranquilos o nerviosos que los inhibidores de las deacetilasas de histona pueden alterar el comportamiento animal. También es relevante para las crías de rata que no reciben

muchos cuidados maternales. Estas son las que normalmente crecen y se vuelven crónicamente estresadas, con una hiperactivación de la producción de cortisol. Si estos animales "faltos de cariño" son tratados con TSA, el primer inhibidor de las deacetilasas de histona que fue identificado, crecen mucho menos estresados. Reaccionan de forma mmucho más parecida a los animales que recibieron muchos cuidados maternales. Los niveles de metilación del ADN en el gen receptor del cortisol en el hipocampo se reducen, aumentando la expresión del receptor y mejorando la sensibilidad del importante bucle retroactivo negativo. Se supone que esto se debe al cruce de caminos que se produce entre la acetilación de las histonas y la metilación del ADN[17].

En el modelo de la derrota social en ratones, los animales susceptibles eran tratados con una droga antidepresiva SSRI. Tras tres semanas de tratamiento su comportamiento era mucho más parecido al de los ratones fuertes. Pero el tratamiento con esta droga antidepresiva no produjo simplemente un aumento en los niveles de serotonina en el cerebro. El tratamiento antidepresivo también produjo un aumento de la metilación del ADN en el promotor de la hormona liberadora de la corticotropina.

Estos estudios son consistentes con un modelo en el que hay un intercambio entre las señales inmediatas de los neurotransmisores y los efectos a más largo plazo en la función celular mediada por las enzimas epigenéticas. Cuando los pacientes con depresión son tratados con drogas SDSRI, los niveles de serotonina en el cerebro empiezan a subir y señalan con más fuerza a las neuronas. El trabajo con animales descrito en el último párrafo sugiere que se necesitan unas cuantas semanas para que estas señales pongan en marcha todos los senderos que en última instancia tienen como resultado el patrón alterado de modificaciones epigenéticas en las células. Esta fase es esencial para el restablecimiento de la función cerebral normal.

La epigenética también es una hipótesis razonable para explicar otro aspecto interesante pero muy lacrante de la depresión severa. Si usted ha sufrido una depresión, tiene un riesgo significativamente más elevado que el de la población en general de sufrir otra en el futuro. Es probable que algunas modificaciones epigenéticas sean excepcionalmente difíciles de revertir y que dejen a las neuronas en un estado más vulnerable ante otro ataque.

Todavía no tenemos la respuesta

Hasta aquí, bien. Todo parece muy consistente con nuestra teoría

sobre el hecho de que las experiencias vitales tienen unos efectos perdurables sobre el comportamiento mediante mecanismos epigenéticos. Y sin embargo, todo el campo de lo que se conoce como neurogenética es probablemente el más polémico desde un punto de vista científico de toda la investigación epigenética.

Para hacernos una idea de lo polémico que es, considérese lo siguiente. Ya hemos encontrado antes al profesor Adrian Bird en este libro. Es considerado como el padre del campo de la metilación del ADN. Otro científico con una gran reputación en este campo es el profesor Tim Bestor, del Centro Médico de la Universidad de Columbia, en Nueva York. Adrian y Tim tienen más o menos la misma edad, un aspecto físico parecido y ambos son personas reflexivas y de hablar pausado. Y al parecer están en desacuerdo en casi todos los temas que tienen que ver con la metilación del ADN. Si uno asiste a un congreso en el que ambos están programados para participar en la misma sesión, tiene garantizado que asistirá a un interesante y apasionado debate entre estos dos científicos. Y sin embargo, si hay una cosa en la que ambos parecen estar de acuerdo públicamente es en su escepticismo respecto a algunas de las afirmaciones que se producen en el campo de la neuroepigenética[18].

Hay tres razones para que ellos, y muchos de sus colaboradores, sean tan escépticos. La primera es que muchos de los cambios epigenéticos que han sido observados son relativamente pequeños. Los escépticos no están convencidos de que unos cambios moleculares tan pequeños puedan producir unos fenotipos tan pronunciados. Sostienen que el hecho de que los cambios estén presentes no significa necesariamente que tengan un efecto funcional. Consideran que las alteraciones en las modificaciones epigenéticas pueden ser meramente correlativas, no causativas.

Los científicos que han investigado las respuestas comportamentales en los diferentes sistemas de roedores contraargumentan que los biólogos moleculares están demasiado habituados a utilizar modelos experimentales artificiales, en los que pueden estudiar cambios moleculares activando y desactivando determinados resultados. Los conductistas sospechan que esto hace que los biólogos moleculares carezcan relativamente de experiencia a la hora de interpretar experimentos en el mundo real, en los que los resultados tienden a ser más “borrosos” y propensos a una mayor variación experimental.

La segunda razón para el escepticismo reside en la naturaleza muy localizada de los cambios epigenéticos. El estrés infantil afecta a unas regiones concretas del cerebro, como el nucleus accumbens, y no a otras. Las marcas epigenéticas solo son alteradas en algunos genes y no en otros. Esta no parece una razón tan evidente para el escepticismo. Aunque normalmente nos refiramos al “cerebro”, hay

montones de regiones y centros especializados dentro de dicho órgano, producto de cientos de millones de años de evolución. De algún modo, todas estas regiones separadas se generan y mantienen durante el desarrollo y más allá, y por tanto pueden claramente responder de modo diferente a los estímulos. Esto vale también para todos nuestros genes en todos nuestros tejidos. Es verdad que desconocemos cómo las modificaciones epigenéticas pueden enfocarse de un modo tan preciso, o cómo la cascada de señales de sustancias químicas como los neurotransmisores lleva a este objetivo. Pero sabemos que, de modo parecido, ocurren unos fenómenos concretos durante el desarrollo normal, ¿por qué no, pues, durante períodos anormales de estrés o de disturbios medioambientales. No porque desconozcamos el mecanismo de algo hemos de deducir que este algo no sucede. Al fin y al cabo, John Gurdon no sabía cómo los núcleos adultos eran reprogramados por el citoplasma de los óvulos, pero eso no significa que sus descubrimientos experimentales no tuvieran validez.

El tercer motivo para el escepticismo es posiblemente el más importante y está relacionado con la propia metilación del ADN. La metilación del ADN en los genes-objetivo del cerebro se establece muy pronto, posiblemente antes del nacimiento y con toda seguridad durante las primeras veinticuatro horas de vida en el caso de los roedores. Lo que esto significa es que todas las crías de rata y de ratón de los experimentos empezaron la vida con un determinado patrón básico de metilación del ADN en su gen receptor del cortisol en el hipocampo. Los niveles de metilación del ADN en este promotor cambian durante la primera semana de vida, en función de la cantidad de cuidados maternos que reciben las crías. Como hemos visto, los niveles de metilación del ADN son más elevados en las crías peor cuidadas. Esto es así porque la metilación del ADN se reduce en aquellas que han sido más lamidas y acicaladas. Lo mismo es cierto del gen de la arginina vasopresina en las crías separadas de sus madres. También lo es del gen de la hormona liberadora de la corticotropina en los ratones adultos suscepibles a la derrota social.

Así pues, en todos los casos, lo que observaron los científicos fue un descenso en la metilación del ADN en respuesta a un estímulo. Y ahí es donde se encuentra, molecularmente, el problema, porque nadie sabe cómo se produce este descenso. En el capítulo 4 vimos que la duplicación del ADN metilado tiene como resultado que una de las hebras del ADN tiene grupos metilo y la otra no. La enzima DNMT1 recorre la hebra recién sintetizada y añade grupos metilo para restablecer el patrón de metilación utilizando la hebra original como plantilla. Podemos especular que en nuestros animales experimentales había menos enzima DNMT1 presente y que por ello caían los niveles

de metilación en el gen. Esto se conoce como desmetilación pasiva del ADN.

El problema es que esto no puede funcionar en las neuronas. Las neuronas están terminalmente diferenciadas –se encuentran en el último valle del paisaje de Waddington, y ya no pueden dividirse. Y dado que no se dividen, las neuronas no duplican su ADN. No tienen motivos para hacerlo. En consecuencia, no pueden perder su metilación de ADN por el método descrito en el capítulo 4.

Una posibilidad es que las neuronas simplemente sueltan el grupo metilo del ADN. Al fin y al cabo, las deacetilasas liberan grupos acetilo de las histonas. Pero el grupo metilo del ADN es diferente. En términos químicos, la acetiación de las histonas es un poco como añadir una pequeña pieza de Lego a otra pieza más grande. Es muy fácil separar las dos piezas. La metilación del ADN es diferente. Se parece más a tener dos piezas de Lego y utilizar cola superfuerte para unirlas.

El enlace químico entre un grupo metilo y la citosina del ADN es tan fuerte que durante mucho tiempo se consideró completamente irreversible. El año 2000, un grupo del Instituto Max Planck de Berlín demostró que este no podía ser el caso. Se demostró que en los mamíferos el genoma paternal experimenta una gran desmetilación del ADN durante las primeras fases del desarrollo. Ya vimos esto en los capítulos 7 y 8. Lo que no dijimos entonces fue que esta desmetilación se produce antes de que el zigoto empiece a dividirse. Dicho de otro modo, la metilación del ADN desaparecía sin que hubiera replicación del ADN[19]. Esto se conoce como desmetilación activa del ADN.

Esto significa que hay un precedente a la eliminación de la metilación del ADN en las células que no se dividen. Tal vez haya un mecanismo similar en las neuronas. Hay mucho debate acerca de cómo la metilación del ADN es activamente eliminada, incluso en las circunstancias bien conocidas del desarrollo temprano. Hay menos consenso acerca de cómo tiene lugar en las neuronas. Una de las razones de que esto sea tan difícil de investigar es que en la desmetilación activa del ADN intervienen muchas proteínas diferentes con una serie de pasos sucesivos. Esto hace que sea difícil recrear el proceso en un laboratorio, que es el patrón oro en este tipo de investigaciones.

Silenciando al silenciador

Como hemos visto repetidamente, la investigación científica a

menudo produce hallazgos inesperados, y esto es lo que sucedió en este caso. Mientras muchos de los investigadores que trabajan en el campo de la epigenética buscaban una enzima que retirase la metilación del ADN, un grupo descubrió unas enzimas que añaden algo extra al ADN metilado. Esto se muestra en la figura 12.3. Curiosamente, esto ha resultado tener muchas de las mismas consecuencias que tiene la desmetilación del ácido nucleico.

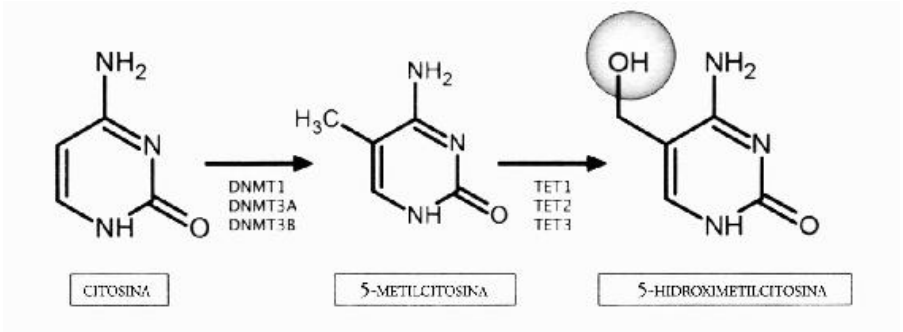

Figura 12.3: Conversión de 5-metilcitosina a 5-hidroximetilcitosina. C: Carbono; H: Hidrógeno; N: Nitrógeno; O: Oxígeno. Para mayor simplicidad, algunos átomos de carbono no se muestran explícitamente, pero están presentes allí donde hay un enlace de dos líneas.

Una pequeña molécula llamada hidroxilo, consistente en un átomo de oxígeno y un átomo de hidrógeno, se añade al grupo metilo, para crear 5-hidroximetilcitosina. Esta reacción la llevan a cabo unas enzimas llamadas TET1, TET2 o TET3[20].

Esto es muy relevante para la cuestión de la desmetilación del ADN, porque son los efectos de la metilación del ADN los que hacen que este sea un cambio importante. La metilación de la citosina afecta a la expresión de los genes porque la citosina metilada liga a determinadas proteínas, como MeCP2. MeCP2 actúa junto con otras proteínas para reprimir la expresión de los genes y para reclutar otras modificaciones represivas como la desacetilación de las histonas. Cuando una enzima como TET1 añade el grupo hidroxilo a la metilcitosina para formar la molécula de 5-hidroximetilcitosina cambia la forma de la modificación epigenética. Si una citosina metilada es como un grano de uva en una pelota de tenis, la 5-hidroximetilcitosina es como un guisante pegado a un grano de uva pegado a una pelota de tenis. Debido a este cambio de forma, la proteína MeCP2 ya no puede unirse al ADN modificado. La célula, por consiguiente, “lee” la 5-hidroximetilcitosina de la misma forma que lee el ADN no metilado.

Muchas de las técnicas utilizadas hasta hace muy poco buscaban la presencia de la metilación del ADN. A menudo no podían distinguir entre el ADN no metilado y el ADN 5-hidroximetilado. Esto significa que muchos de los trabajos que se refieren a un descenso de la metilación del ADN puede que, sin saberlo, se estén refiriendo a un aumento de la 5-hidroximetilación. Todavía no ha sido probado, es posible que en vez de desmetilar el ADN, como se dice en algunos de los estudios comportamentales, lo que hacen realmente las neuronas es convertir 5-metilcitosina en 5-hidroximetilcitosina. Las técnicas para estudiar 5-hidroximetil- citosina están todavía en desarrollo, pero sabemos ya que las neuronas contienen niveles de esta sustancia

química superiores a los de cualquier otro tipo de célula[21].

Recuerda, recuerda

Pese a estas controversias, sigue la investigación sobre la importancia de las modificaciones epigenéticas en la función cerebral. Un campo que está atrayendo mucha atención es el de la memoria. La memoria es un fenómeno increíblemente complejo. Tanto el hipocampo como una región del cerebro llamada córtex están implicados en la memoria, pero de forma diferente. El hipocampo está principalmente implicado en la consolidación de los recuerdos, porque nuestro cerebro decide qué es lo que vamos a recordar. El hipocampo es muy plástico en su forma de operar, y esto al parecer está asociado con los cambios efímeros en la metilación del ADN, de nuevo mediante unos mecanismos aún no determinados. El córtex se utiliza para el almacenamiento a largo plazo de los recuerdos. Cuando los recuerdos se almacenan en el córtex se producen cambios prolongados en la metilación del ADN.

El córtex es como el disco duro de un ordenador con una capacidad de almacenamiento de muchos gigabytes. El hipocampo es más como el chip de la RAM (la memoria de acceso aleatorio), en el que los datos se procesan temporalmente antes de ser borrados o transferidos al disco duro para su almacenamiento permanente. Nuestro cerebro separa diferentes funciones en poblaciones seleccionadas de células en diferentes regiones anatómicas. Es por esto que la pérdida de memoria raramente es completa. En función de las circunstancias clínicas concretas, por ejemplo, o bien la memoria a corto plazo o la memoria a largo plazo pueden perderse relativamente o permanecer relativamente intactas. Es muy lógico que estas diferentes funciones estén separadas en sus cerebros. Imaginemos cómo sería la vida si lo recordásemos absolutamente todo –el número de teléfono que marcamos una sola vez, cada una de las palabras que nos dirigió un pasajero desconocido en el metro, o el menú del restaurante al que fuimos un viernes de hace tres años.

La complejidad de nuestros sistemas de memoria es uno de los motivos de que sea un área difícil de estudiar, porque puede ser difícil montar experimentos en los que estemos absolutamente seguros de qué aspectos de la memoria abordan realmente nuestras técnicas experimentales. Pero una cosa que sabemos seguro es que la memoria implica cambios a largo plazo en la expresión de los genes y en la forma en que las neuronas establecen conexiones entre sí. Y esto nos lleva de nuevo a la hipótesis de que los mecanismos epigenéticos

pueden desempeñar un papel.

En los mamíferos, tanto la metilación del ADN como las modificaciones de las histonas, desempeñan un papel en la memoria y en el aprendizaje. Los estudios con roedores han puesto de manifiesto que estos cambios pueden afectar a genes muy concretos en regiones discretas del cerebro, como era de esperar. Por ejemplo, las proteínas metiltransferasas del ADN, la DNMT3A y la DNMT3B aumentan en expresión en el hipocampo de las ratas adultas en un determinado modelo del aprendizaje y la memoria. A la inversa, tratando el tratamiento de estas ratas con un inhibidor de la metiltransferasa del ADN como la 5-azacitidina bloquea la formación de la memoria y afecta tanto al hipocampo como al córtex[22].

Un gen particular de la histona acetiltransferasa (una proteína que añade grupos acetilo a las histonas) sufre una mutación en una enfermedad humana llamada síndrome de Rubinstein-Taybi. El retraso mental es un síntoma frecuente de esta enfermedad. Los ratones con una versión mutante de este gen también tienen niveles bajos de acetilación de las histonas en el hipocampo, como era previsible. También tienen problemas importantes en el procesamiento de la memoria a largo plazo en el hipocampo[23]. Cuando estos ratones fueron tratados con SAHA, el inhibidor de las deacetilasas de histona, los niveles de acetilación en el hipocampo aumentaron, y los problemas de memoria mejoraron[24].

El SAHA puede inhibir muchas deacetilasas de histona diferentes, pero en el cerebro algunos de sus objetivos parecen ser más importantes que otros. Las dos enzimas de esta clase con mayores niveles de expresión son HDAC1 y HDAC2. Estas difieren en la forma en que se expresan en el cerebro. HDAC1 se expresa predominantemente en las células troncales neurales y en la población de no-neuronas de sostén y protectoras llamadas células gliales. HDAC2 se expresa predominantemente en células neuronales[25], por lo que no tiene nada de sorprendente que esta sea la deacetilasa de histona más importante en la memoria y el aprendizaje.

Los ratones cuyas neuronas sobre-expresan Hdac2 tienen una pobre memoria a largo plazo, aunque su memoria a corto plazo sea buena. Los ratones cuyas neuronas no expresan ninguna Hdac2 tienen una memoria excelente. Estos datos nos muestran que Hdac2 tiene un efecto negativo en el almacenamiento de la memoria. Las neuronas que sobre-expresaban Hdac2 formaban muchas menos conexiones de lo normal, mientras lo contrario es cierto de las neuronas que carecen de Hdac2. Esto respalda nuestro modelo según el cual los cambios de base epigenética en la expresión de los genes alteran eventualmente las redes complejas del cerebro. El SAHA mejora la memoria en los ratones que sobre-expresan Hdac2, presumiblemente reduciendo sus

efectos en la acetilación de las histonas y en la expresión de los genes. El SAHA también mejora la memoria en los ratones normales[26].

De hecho, el aumento de los niveles de acetilación en el cerebro parece estar sistemáticamente asociado con una memoria mejorada. Tanto el aprendizaje como la memoria mejoraron en ratones mantenidos en unas condiciones conocidas como ambientalmente enriquecidas. Esta es una extravagante manera de decir que tenían acceso a dos ruedas de ejercicios y al interior de un rollo de papel higiénico. Los niveles de acetilación de las histonas en el hipocampo y en el córtex aumentaban en los ratones que se encontraban en un entorno más entretenido. Incluso en estos ratones, los niveles de acetilación de las histonas y la memoria mejoraban aún más si eran tratados con SAHA[27].

Podemos ver aquí la emergencia de una tendencia sistemática. En varios sistemas modelo diferentes, el aprendizaje y la memoria mejoran cuando los animales son tratados con inhibidores de la ADN metiltransferasa, y especialmente con los inhibidores de las deacetilasas de histona. Como vimos en el último capítulo, hay drogas autorizadas en estas dos clases, como la 5-azacitidina y el SAHA, respectivamente. Es muy tentador especular con tomar estas drogas anticancerígenas y utilizarlas en aquellas enfermedades en las que la pérdida de la memoria es un grave problema clínico, como en el Alzheimer. Tal vez podríamos incluso utilizarlas para mejorar la memoria en la población en general.

Desafortunadamente, hay dificultades sustanciales para ello. Estas drogas tienen efectos secundarios que pueden incluir fatiga severa, náuseas y un elevado riesgo de infecciones. Estos efectos secundarios son considerados aceptables si la alternativa es una muerte por cáncer prematura e inevitable. Pero podrían ser consideradas menos aceptables para tratar las fases tempranas de la demencia, cuando el paciente todavía tiene una calidad de vida relativamente razonable. Y serían ciertamente inaceptables para la población en general.

Hay un problema adicional. Muchas de estas drogas cuestan realmente mucho de introducir en el cerebro. En muchos de los experimentos con roedores, las drogas eran administradas directamente en el cerebro, y a menudo en regiones definidas del mismo, como el hipocampo. Este no es un método de tratamiento realista en pacientes humanos.

Hay muy pocos inhibidores de las deacetilasas de histona que entren en el cerebro. Una droga llamada valproato de sodio se ha utilizado durante décadas para tratar la epilepsia, y tiene que introducirse claramente en el cerebro para surtir efecto. Recientemente nos hemos dado cuenta de que este compuesto es también un inhibidor de las deacetilasas de histona. Esto sería sumamente alentador para tratar de

utilizar drogas epigenéticas en el Alzheimer, pero desafortunadamente el valproato de sodio solo inhibe las deacetilasas de histona muy débilmente. Todos los datos animales sobre el aprendizaje y la memoria han mostrado que los inhibidores más fuertes funcionan mucho mejor que los débiles revirtiendo estos déficits.

No es solo en enfermedades como el Alzheimer que las terapias epigenéticas podrían ser útiles si consiguiésemos desarrollar las drogas adecuadas. Entre un 5 y un 10 por ciento de los consumidores habituales de cocaína se vuelven adictos a la droga y desarrollan un ansia incontrolable por este estimulante. Un fenómeno similar tiene lugar en los roedores si se da a los animales acceso ilimitado a la droga. La adicción a estimulantes como la cocaína es un clásico ejemplo de adaptaciones inapropiadas de los circuitos de memoria y recompensa del cerebro. Estas adaptaciones negativas las regulan unos cambios duraderos en la expresión de los genes. En la base de esta adicción hay unos cambios en la metilación del ADN y en cómo la metilación es leída por MeCP2. Esto sucede por medio de un conjunto de interacciones que no comprendemos muy bien entre factores señalizadores, enzimas modificadoras y lectoras de las histonas, y miARN. Unos senderos circuitos relacionados con este están en la base de la adicción a las anfetaminas[28, 29].

Si regresamos al punto de partida de este capítulo, está claro que existe la necesidad de evitar que los niños que han sufrido traumas infantiles se conviertan en adultos con un riesgo superior a la media de desarrollar enfermedades mentales. Es muy seductor pensar que podríamos ser capaces de utilizar drogas epigenéticas para mejorar sus oportunidades de vida. Desgraciadamente, uno de los problemas a la hora de diseñar terapias para niños que han sufrido abandono o malos tratos es que resulta muy difícil identificar aquellos que han sido permanentemente dañados como adultos y aquellos que tendrán unas vidas sanas y felices. Hay unas prevenciones éticas muy importantes en administrar drogas a los niños si no estamos seguros de que realmente necesitan el tratamiento. Además, los ensayos clínicos que podrían determinar si las drogas tendrían efectivamente utilidad durarían décadas, lo que hace que económicamente sean casi inasumibles para ninguna compañía farmacéutica.

Pero no podemos terminar con una nota excesivamente negativa. Veamos una interesante historia relativa a un fenómeno y a una conducta epigenéticos. Hay un gen llamado Grb10 implicado en varios senderos circuitos de señales. Es un gen con impronta, y el cerebro solo expresa la copia heredada del padre. Si desactivamos esta copia paterna, el ratón no puede producir ninguna proteína Grb10 y los animales desarrollan un fenotipo muy extraño. Mordisquean el pelo de la cara de los otros ratones que están en la misma jaula. Es una

especie de acicalamiento agresivo, algo parecido al picoteo jerárquico de las gallinas. Además, enfrentados con un ratón más grande que ellos al que no conocen, los ratones mutantes Grb10 no se echan atrás –se mantienen firmes[30].

La desactivación de Grb10 en el cerebro tiene como resultado lo que podríamos calificar de ratón muy chulo o gallito. Puede incluso parecer extraño que este gen esté normalmente activado en el cerebro. ¿Acaso los ratones con el gen Grb10 desactivado no serían los más machotes y exitosos? En realidad es más correcto decir que serían los ratones que más probabilidades tendrían de salir apaleados. Hay muchos ratones en el mundo, y se encuentran unos con otros con mucha frecuencia. Vale la pena saber reconocer cuando uno tiene las de perder.

Cuando el gen Grb10 está desactivado en el cerebro, para el ratón es como una mala experiencia de fin de semana. Traduzcámoslo en términos humanos para ver por qué. Usted está en la barra de un bar tomándose tranquilamente una cerveza cuando un tipo dos veces más grande que usted pasa por su lado como un mastodonte y le vuelca la cerveza. Cuando el gen en cuestión está desactivado, es como si usted tuviera un amigo a su lado que le dice: "Pero ¿qué haces? No te rajes. Dale su merecido." Todos sabemos lo mal que pueden acabar estas situaciones. Acabemos, pues, este capítulo brindando por el gen Grb10, el gen con impronta al que le gusta decir: "Déjalo estar, hombre, no vale la pena pelearse por esto."

1. Para una reseña reciente, véase Heim et al. (2010), Dev Psychobiol. 52: 671-90.
2. Yehuda et al. (2001), Dev Psychopathol. 13: 733-53.
3. Hein et al. (2000), JAMA 284: 592-7.
4. Lee et al. (2005), Am J Psychiatry 162: 995-997.
5. Carpenter et al. (2004), Neuropsychopharm. 29: 777-784.
6. Weaver et al. (2004), Nature Neuroscience 7: 847-854.
7. Murgatroyd et al. (2009), Nature Neuroscience 12: 1.559-1.565.
8. Skene et al. (2010), Mol Cell 37: 4.576-68.
9. McGowan et al. (2009), Nature Neuroscience 12: 342-348.
10. http://www.who.int/mental_health/management/depression/definition/en/
11. Reseñado en Uchida et al. (2011), Neuron 69: 359-372.
12. Uchida et al. (2011), Neuron 69: 359-372.
13. Elliott et al. (2010), Nature Neuroscience 13: 1.351-1.353.
14. Uchida et al. (2011), Neuron 69: 359-372.
15. Para una reseña útil de los modelos animales de depresión, véase Nestler y Hyman (2010), Nature Neuroscience 13: 1.161-1.169.
16. Uchida et al. (2011), Neuron 69: 359-372.
17. Weaver et al. (2004), Nature Neuroscience 7: 847-854.

18. Véanse, por ejemplo, las entrevistas en Bychen (2010), Nature 467: 146-148.
19. Mayer et al. (2000), Nature 403: 501-502.
20. Tahiliani et al. (2009), Science 324: 30-5.
21. Globisch et al. (2010), PLoS One 5: el 5.367.
22. Para una reseña útil de la metilación del ADN y la formación de la memoria, véase Day y Sweatt (2010), Nature Neuroscience 13: 1.319-1.329.
23. Korzus et al. (2004), Neuron 42: 961-972.
24. Alarcón et al. (2004), Neuron 42: 947-959.
25. MacDonald y Roskams (2008), Dev Dyn. 237: 2.256-2.267.
26. Guan et al. (2009), Nature 459: 55-60.
27. Fischer et al. (2007), Nature 447: 178-182.
28. Im et al. (2010), Nature Neuroscience 13: 1.120-1.127.
29. Deng et al. (2010), Nature Neuroscience 13: 1.128-1.136.
30. Garfield et al. (2011), Nature 469: 534-538.

Capítulo 13
Yendo cuesta abajo

Yo diría que no me molesta tanto ser viejo, como ser viejo y gordo.
Benjamin Franklin

El tiempo pasa. Envejecemos. Es inevitable. Y a medida que envejecemos nuestro cuerpo cambia. Una vez pasados los treinta y tantos, la mayoría estamos de acuerdo en que cada vez es más y más difícil mantener el mismo nivel de forma física. Tanto da que sea lo rápido que podemos correr, el tiempo que podemos estar pedaleando sin parar a descansar o lo que tardamos en recuperarnos de una salida nocturna; el hecho es que cuanto más viejos somos, más difícil se vuelve todo. Tenemos cada vez más dolores y achaques y sucumbimos más fácilmente a una serie de molestas pequeñas infecciones.

El hecho de envejecer es algo que todos reconocemos fácilmente en los demás. Incluso los niños muy pequeños pueden distinguir a las personas jóvenes de las viejas, aunque se muestran un poco confusos con las personas de edades intermedias. Los adultos podemos distinguir fácilmente a una persona de unos 20 años de otra de unos 40, o a una de unos 40 de otra de unos 60.

Podemos distribuir intuitivamente a la gente en grupos de edad aproximados no porque emitan señales intrínsecas de radio acerca del número de años que llevan en la Tierra, sino por los signos físicos del envejecimiento, signos como la pérdida de grasa subcutánea, la mayor flacidez o la menor tersura de nuestro cutis, las arrugas, la caída del tono muscular, la ligera curvatura de la columna vertebral.

La expansión de la industria de la cosmética y la cirugía estética parece incesante y pone de manifiesto lo desesperados que estamos en nuestro afán de combatir los síntomas del envejecimiento. Según cifras publicadas en el 2010, en los primeros 25 países estudiados en una encuesta realizada por la International Society of Aesthetic Plastic Surgery, el año 2009 se realizaron más de ocho millones y medio de intervenciones quirúrgicas y aproximadamente otras tantas intervenciones no quirúrgicas, como implantes de Botox o dermoabrasiones. Estados Unidos encabezaba la lista, y Brasil y China se disputaban el segundo lugar[1].

Como sociedad no parece importarnos realmente el número de años que llevamos vivos, pero nos repugna profundamente la decadencia física que ello conlleva. Y no son solo los aspectos banales del

envejecimiento. Uno de los mayores factores de riesgo para desarrollar un cáncer es el simple hecho de ser viejo. Lo mismo puede decirse de enfermedades como el Alzheimer o un derrame cerebral.

La mayoría de avances realizados hasta ahora en el campo médico y sanitario han mejorado la longevidad o la calidad de la vida. Esto se debe en parte a que la mayoría de avances se han centrado en evitar la muerte prematura de niños. La vacunación contra enfermedades graves como la polio, por ejemplo, ha mejorado enormemente tanto las cifras de mortalidad infantil (menos muertes de niños) como la morbilidad en términos de calidad de vida para los supervivientes (menos niños permanentemente inválidos a consecuencia de la polio).

Hay un debate cada vez mayor respecto al tema conocido como la extensión de la vida humana, que trata de alargar la última etapa de la vida, la vejez. La extensión de la vida humana se refiere a todas las intervenciones que podemos llevar a cabo para alargar la vida humana. Pero esto nos adentra en un territorio difícil, tanto social como científicamente. Para comprender por qué, es importante establecer en qué consiste realmente el envejecimiento, y por qué es algo más que simplemente estar vivo durante más tiempo.

Una definición útil del envejecimiento es "el progresivo declive funcional de los tejidos que lleva eventualmente a la muerte"[2]. Esta decadencia funcional, más que el destino final, es el aspecto del envejecimiento que resulta más deprimente a la mayoría de las personas.

Hablando en general, la mayoría de nosotros somos conscientes de la importancia que tiene esta cuestión de la calidad de la vida. Por ejemplo, en una encuesta realizada el año 2010 a 605 australianos adultos, aproximadamente la mitad de ellos manifestó que no tomarían una píldora antienvejecimiento en caso de que se inventase una. La lógica implícita en su elección se basaba en la calidad de vida. Los encuestados no creían que esta píldora prolongase una vida sana. Simplemente vivir más tiempo no era una perspectiva atractiva para ellos si iba asociada con un aumento de achaques y problemas de salud. Solo lo era si iba asociada con una mejora de la salud en los últimos años de la vida[3].

Hay, pues, dos aspectos independientes en toda discusión científica sobre el envejecimiento. Son el de la propia duración de la vida, y el del control de la aparición de enfermedades asociadas con la edad. Lo que no está tan claro es en qué medida es posible o razonable separar estos dos aspectos, al menos en humanos.

La epigenética, definitivamente, tiene un papel a desempeñar en la cuestión del envejecimiento. No es el único factor importante, pero sí uno de los más significativos. El campo de la epigenética y el envejecimiento también ha llevado a una de las disputas más

enconadas que se han producido recientemente en el sector farmacéutico, como veremos hacia el final de este capítulo.

Hemos de preguntarnos por qué nuestras células funcionan mal a medida que envejecemos y nos dejan con un riesgo mayor de contraer enfermedades como el cáncer, la diabetes de tipo 2, diversas dolencias cardiovasculares y la demencia senil, entre otras muchas enfermedades. Un motivo de ello es que el guión del ADN en las células empieza a cambiar para peor. Acumula alteraciones aleatorias en secuencia. Estas son mutaciones somáticas que afectan a las células corporales pero no a las de la línea germinal. Muchos cánceres tienen su origen en los cambios que se producen en la secuencia de ADN, a menudo causados por recombinaciones en los cromosomas en los que el material genético es intercambiado de un cromosoma a otro.

Culpa por asociación

Pero, como hemos visto, nuestras células contienen múltiples mecanismos para mantener el programa del ADN lo más intacto posible. Siempre que sea posible, la instrucción por defecto de una célula es mantener al genoma en su estado original. Pero el epigenoma es diferente. Por su misma naturaleza, es mucho más flexible y plástico que el genoma. Debido a ello, no es probablemente ninguna sorpresa que las modificaciones epigenéticas cambien a medida que un animal envejece. El epigenoma puede volverse finalmente mucho más propenso que el genoma a sufrir cambios con la edad, porque de todos modos el epigenoma es más naturalmente variable que el genoma.

Hemos visto algunos ejemplos de esto en el capítulo 5, donde discutimos cómo los gemelos genéticamente idénticos se volvían menos epigenéticamente idénticos a medida que envejecían. La cuestión de cómo el epigenoma cambia a medida que envejecemos ha sido examinada aún más directamente. Los investigadores estudiaron dos grandes grupos de personas de Islandia y de Utah que habían formado parte de unos estudios en curso a largo plazo de la población. Se extrajo ADN de unas muestras de sangre tomadas de estas personas con unos intervalos de entre once y dieciséis años de distancia. La sangre contiene glóbulos rojos y glóbulos blancos. Los glóbulos rojos transportan oxígeno por todo el cuerpo y son esencialmente como bolsas de hemoglobina. Los glóbulos blancos son las células que generan respuestas inmunes a las infecciones. Estas células retienen sus núcleos y contienen ADN.

Los investigadores encontraron que los niveles generales de

metilación del ADN en los glóbulos blancos de algunos de estos individuos cambiaban con el tiempo. El cambio no era siempre el mismo. En algunos individuos, los niveles de metilación del ADN aumentaban con la edad; en otros disminuían. La dirección del cambio parecía tener una base familiar. Esto puede significar que el cambio relacionado con la edad que se produce en la metilación del ADN estaba genéticamente influido o afectado por los factores medioambientales compartidos por una familia. Los científicos también analizaron con detalle la metilación de más de 1.500 grupos CpG en el genoma. Estos sitios estaban principalmente asociados con genes codificadores de proteínas. Encontraron las mismas tendencias en estos sitios que las que habían encontrado en los niveles de metilación del ADN en general. En algunos individuos, la metilación del ADN en estos sitios concretos aumentaba y en otros disminuía. Los niveles de metilación del ADN aumentaban o disminuían al menos un 20 por ciento en aproximadamente una de cada diez personas estudiadas.

Los autores declararon en su conclusión que "estos datos respaldan la idea de que la pérdida relacionada con la edad de los patrones epigenéticos normales es un mecanismo para la aparición tardía de enfermedades humanas comunes"[4]. Es cierto que los datos son consistentes con este modelo de mecanismos epigenéticos que causan la aparición tardía de la enfermedad, pero hay determinadas limitaciones que hemos de tener en cuenta.

En particular, este tipo de estudios ponen de manifiesto la existencia de importantes correlaciones entre cambio epigenético y enfermedad en la vejez, pero no demuestran que una cosa sea la causa de la otra. Las muertes por ahogamiento son más comunes cuando las ventas de lociones bronceadoras son más altas. De esto podría inferirse que las lociones bronceadoras tienen algún efecto en las personas que las hace más propensas a morir ahogadas. La realidad, por supuesto, es que las ventas de lociones bronceadoras suben durante los períodos más calurosos, que es también cuando es más probable que las personas vayan a nadar. Cuantas más personas van a nadar, mayor es el número de las que se ahogan, por término medio. Hay una correlación entre los dos factores que hemos observado (las ventas de lociones bronceadoras y las muertes por ahogamiento) pero esto no significa que una cosa cause la otra.

Así pues, aunque sabemos que las modificaciones epigenéticas cambian con el tiempo, esto no demuestra que estas alteraciones causen las enfermedades y la degeneración asociadas con la vejez. En teoría, los cambios podrían simplemente ser variaciones aleatorias sin consecuencias funcionales. Podrían ser simplemente cambios en el "ruido de fondo" epigenético de una célula. En muchos casos ni

siquiera sabemos si los patrones alterados de modificaciones epigenéticas producen cambios en la expresión de los genes. Abordar esta cuestión es sumamente difícil, especialmente en el caso de las poblaciones humanas.

Culpa por algo más que asociación

Dicho esto, hay determinadas modificaciones epigenéticas que están definitivamente involucradas en la iniciación o en la progresión de la enfermedad. Los argumentos a favor de esto son más consistentes en el caso del cáncer, como vimos en el capítulo 11. Entre ellos se incluyen las drogas epigenéticas utilizadas en el tratamiento de ciertos tipos de cáncer. También se incluyen los muchos datos obtenidos de los sistemas experimentales. Estos datos muestran que la alteración de la regulación epigenética en una célula aumenta la probabilidad de que una célula se vuelva cancerosa o que una célula ya cancerosa se vuelva más agresiva.

Una de las áreas que tratamos en el capítulo 11 fue la del aumento en la metilación del ADN que tiene lugar frecuentemente en los promotores de los genes supresores de tumores. Este aumento en la metilación del ADN desactiva la expresión de los genes supresores de tumores. Curiosamente, este aumento en la metilación del ADN en sitios específicos se produce a menudo sobre un fondo general de reducción de la metilación del ADN en otras muchas áreas del genoma de la misma célula cancerosa. Esta reducción en la metilación puede estar causada por una caída en la expresión o en la actividad de la metiltransferasa de mantenimiento del ADN, DNMT1. Esta reducción en la metilación global del ADN puede también contribuir al desarrollo del cáncer.

Para investigarlo, Rudi Jaenisch generó ratones que solamente expresaban la proteína Dnmt1 a un 10 por ciento aproximadamente de los niveles normales en sus células. Los niveles de metilación del ADN en sus células eran muy bajos comparados con los de los ratones normales. Además de ser bastante raquíticos al nacer, estos ratones mutantes Dnmt1 desarrollaron unos tumores muy agresivos en el sistema inmunológico (linfomas de las células T) cuando alcanzaban entre los cuatro y los ocho meses de edad. Esto estaba asociado con la recombinación de determinados cromosomas, y especialmente con una copia extra del cromosoma 15 en las células cancerosas.

El profesor Jaenisch especuló que los bajos niveles de metilación del ADN hacían a los cromosomas muy inestables y propensos a roturas. Esto ponía a los cromosomas en un riesgo muy elevado de unirse de

formas inapropiadas. Es como partir por la mitad un caramelo cilíndrico de fresa y uno de menta para obtener cuatro caramelos en total, y luego utilizar azúcar fundido para unir las cuatro piezas y obtener dos caramelos cilíndricos completos. Pero si esto se hace a oscuras puede darse el caso de que se creen caramelos "híbridos" en los que una mitad sea de fresa y la otra mitad de menta.

El resultado final del aumento de la inestabilidad de los cromosomas en los ratones de Rudi Jaenisch fue la expresión anormal de los genes. Esto a su vez llevó a la proliferación de unas células muy invasivas y agresivas que acabaron produciendo un cáncer[5, 6]. Estos datos son uno de los motivos de que no sea probable que los inhibidores de las DNMT se usen como drogas en otras cosas que en el cáncer. Se teme que las drogas causarían un descenso de la metilación del ADN en las células normales, lo que podría predisponer a algunos tipos de célula a volverse cancerosas.

Estos datos sugieren que el nivel de metilación del ADN en sí mismo no es lo fundamental. Lo importante es dónde se producen en el genoma los cambios en la metilación del ADN.

El descenso generalizado en los niveles de metilación del ADN que se produce con la edad también se ha encontrado en otras especies diferentes de los humanos y los ratones, como en las ratas y los salmones jorobados[7]. No está del todo claro por qué los bajos niveles de metilación del ADN están asociados con la inestabilidad del genoma. Puede que se deba a que los niveles elevados de metilación del ADN pueden llevar a una estructura del ADN muy compacta, que puede ser estructuralmente más estable. Al fin y al cabo es fácil cortar un solo cable delgado de alambre con unas tenazas, pero mucho más difícil si este cable ha sido doblado formando un denso nudo de metal.

Es importante darse cuenta del esfuerzo que ponen las células en cuidar de sus cromosomas. Si un cromosoma se rompe, la célula reparará la rotura si puede hacerlo. Si no puede, pondrá en marcha un mecanismo autodestructor y cometerá lo que esencialmente es un suicidio celular, porque los cromosomas dañados pueden ser peligrosos. Es preferible matar a una célula a que sobreviva con el material genético dañado. Supongamos, por ejemplo, que una copia del cromosoma 9 y una copia del cromosoma 22 se rompen en la misma célula. Podrían repararse correctamente, pero a veces la reparación sale mal y una parte del cromosoma 9 se une con una parte del cromosoma 22.

Esta recombinación de los cromosomas 9 y 22 se produce en realidad con relativa frecuencia en las células del sistema inmunológico. De hecho, se produce tan a menudo que este híbrido 9:22 tiene un nombre propio. Se conoce como el cromosoma Filadelfia, por la ciudad en que fue descrito por vez primera. El 95 por

ciento de las personas que tienen una forma de cáncer llamada leucemia mieloide crónica tienen el cromosoma Filadelfia en sus células cancerosas. Este cromosoma anormal causa este cáncer en las células del sistema inmunológico debido al lugar del genoma en el que se produce la rotura y la recombinación. La fusión de las dos regiones cromosómicas tiene como resultado la creación de un gen híbrido llamado Bcr-Abl. La proteína codificada por este gen híbrido estimula de un modo muy agresivo la proliferación de las células.

Nuestras células, por consiguiente, han desarrollado mecanismos muy sofisticados y rápidos para reparar cromosomas rotos lo más rápidamente posible para evitar este tipo de fusiones. Para ello, nuestras células tienen que ser capaces de reconocer cabos sueltos del ADN, cabos que se crean cuando un cromosoma se rompe en dos.

Pero hay un problema. Cada cromosoma de nuestras células tienen de un modo natural dos cabos sueltos de ADN, uno en cada extremo. Algo tiene que impedir a la maquinaria de reparación del ADN pensar que estos cabos sueltos necesitan ser reparados. Este algo es una estructura especializada llamada telómero. Hay un telómero en cada extremo de cada cromosoma, lo que hace un total de 92 telómeros por célula en los humanos. Estos telómeros impiden que la maquinaria de reparación del ADN se aplique a los extremos de los cromosomas.

Los extremos de las colas

Los telómeros desempeñan un papel fundamental en el control del envejecimiento. Cuanto más se divide una célula, más pequeños se vuelven los telómeros. Esencialmente, a medida que envejecemos, los telómeros se hacen más cortos, y finalmente son tan pequeños que ya no funcionan correctamente. Las células dejan de dividirse y pueden incluso activar sus mecanismos autodestructores. Las únicas células en las que esto es diferente son las células germinales que eventualmente dan lugar a los óvulos o a los espermatozoides. En estas células los telómeros siempre permanecen largos, por lo que la siguiente generación no se ve afectada por lo que respecta a la longevidad. El año 2009 se concedió el premio Nobel de Fisiología o Medicina a Elizabeth Blackburn, Carol Greider y Jack Szostak por su trabajo sobre el funcionamiento de los telómeros.

Ya que los telómeros son tan importantes en el envejecimiento, es lógico que consideremos cómo interactúan con el sistema epigenético. El ADN de los telómeros de los vertebrados consiste en cientos de repeticiones de la secuencia TTAGGG. No hay genes en el telómero. También podemos ver en la secuencia que no hay motivos CpG en los

telómeros, por lo que no puede haber metilación del ADN. Si hay efectos epigenéticos que influyen en los telómeros tendrán que basarse, por consiguiente, en las modificaciones de las histonas.

Entre los telómeros y las partes principales del cromosoma hay fragmentos de ADN conocidos como regiones subteloméricas. Estas regiones contienen muchos trozos de ADN repetitivo. Estas repeticiones son menos reducidaos en secuencia que los telómeros. Las regiones subteloméricas contienen una baja frecuencia de genes. Contienen algunos grupos CpG, por lo que estas regiones pueden ser modificadas por la metilación del ADN además de las modificaciones de las histonas.

El tipo de modificaciones epigenéticas que se encuentran normalmente en los telómeros y en las regiones subteloméricas son modificaciones represivas. Debido a que de todos modos hay muy pocos genes en estas regiones, estas modificaciones probablemente no se usan para desactivar genes individuales. Estas modificaciones epigenéticas represivas están probablemente implicadas en el "aplastamiento" de los extremos de los cromosomas. Las modificaciones epigenéticas atraen proteínas que cubren los extremos de los cromosomas y contribuyen a que estos estén tan enroscados y que sean tan densos e inaccesibles como sea posible. Es como cubrir los extremos de un tubo con material aislante.

Para una célula es potencialmente un problema que todos sus telómeros tengan la misma secuencia de ADN, porque secuencias idénticas en un núcleo tienden a encontrarse y a ligarse unas con otras. Esta proximidad crea el peligro de que los extremos de cromosomas diferentes se unan, especialmente si están dañados y abiertos. Esto puede llevar a toda clase de errores mientras las células se esfuerzan para poner orden en las cadenas de cromosomas, y pueden tener como consecuencia una "maraña" de cromosomas similar a la que causa la leucemia mieloide crónica. Cubriendo los telómeros con modificaciones represivas que hacen que los extremos de los cromosomas estén más densamente empaquetados, es menos probable que cromosomas diferentes se unan inapropiadamente.

La célula, sin embargo, se encuentra atrapada en un dilema, como se muestra en la figura 13.1.

Si los telómeros son muy cortos, la célula tiende a cerrarse. Pero si los telómeros son muy largos aumenta el riesgo de que diferentes cromosomas se unan y creen nuevos genes promotores del cáncer. El cierre de la célula es probablemente un mecanismo de defensa que ha evolucionado para minimizar el riesgo de la creación de nuevos genes inductores del cáncer. Este es uno de los motivos de que probablemente sea muy difícil crear drogas que aumenten la longevidad sin aumentar también el riesgo de cáncer.

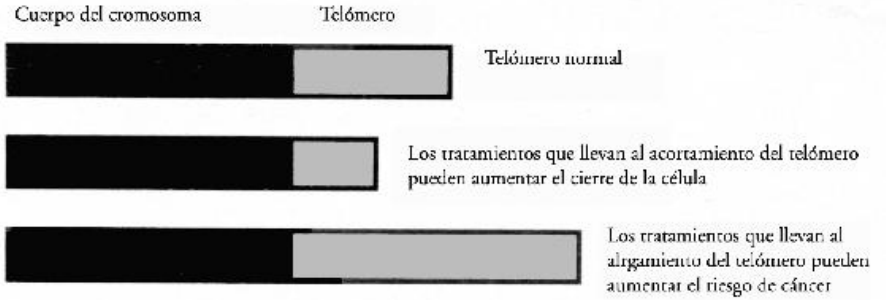

Figura 13.1: Tanto el acortamiento como el alargamiento anormales de los telómeros tienen consecuencias potencialmente deletéreas para las células.

¿Qué sucede cuando creamos nuevas células pluripotentes? Esto podría hacerse mediante transferencia nuclear de células somáticas, como vimos en el capítulo 1, o mediante la creación de células iPS, como vimos en el capítulo 2. Podemos utilizar estas técnicas para crear animales clonados no humanos, o células madres humanas para tratar enfermedades degenerativas. En ambos casos, queremos crear células con una longevidad normal. Al fin y al cabo, no tiene demasiado sentido crear un nuevo semental de primera calidad, o células para implantar en el páncreas de un adolescente con diabetes, si el caballo o las células mueren al poco tiempo de "envejecimiento" de los telómeros.

Esto significa que necesitamos crear células con telómeros que tengan aproximadamente la misma longitud que los de los embriones normales. En la naturaleza esto se produce porque los cromosomas de la línea germinal están protegidos del acortamiento telomérico. Pero si generamos células pluripotentes a partir de células relativamente adultas, estaremos tratando con núcleos en los que probablemente los telómeros serán relativamente cortos, porque las células "iniciales" se toman de adultos cuyos cromosomas se han acortado con la edad.

Afortunadamente sucede algo insólito cuando creamos células pluripotentes experimentalmente. Cuando las células iPS son creadas activan la expresión de un gen llamado telomerasa. Normalmente, la telomerasa mantiene a los telómeros con una longitud sustancial. Sin embargo, a medida que envejecemos, la actividad de la telomerasa en nuestras células empieza a disminuir. Es importante activar el gen de la telomerasa en las células iPS, o las células tendrán unos telómeros muy cortos y no crearán

muchas generaciones de células hijas. Los factores de Yamanaka inducen la expresión de altos niveles de telomerasa en las células iPS.

Pero no podemos usar la telomerasa para tratar de revertir o de retardar el envejecimiento humano. Aunque pudiéramos introducir esta enzima en las células, tal vez mediante terapia génica, las

probabilidades de inducir un cáncer serían demasiado grandes. El sistema telomérico está muy equilibrado, y lo mismo cabe decir de la relación envejecimiento-cáncer.

Tanto los inhibidores de las deacetilasas de histona como los inhibidores de la ADN metiltransferasa mejoran la eficiencia de los factores de Yamanaka. Esto puede ser en parte debido a que estos compuestos contribuyen a eliminar algunas de las modificaciones represivas en los telómeros y en las regiones subteloméricas. Esto puede facilitar que la telomerasa construya los telómeros cuando las células son reprogramadas.

La interacción de las modificaciones epigenéticas con el sistema telomérico nos lleva algo más allá de una simple correlación entre epigenética y envejecimiento. Nos acerca a un modelo desde el que podemos empezar a tener confianza en que los mecanismos epigenéticos pueden realmente desempeñar un papel causativo en por lo menos algunos aspectos del envejecimiento.

¿Envejece la cerveza?

Para investigar esto mejor, los científicos han hecho un uso muy amplio de un organismo con el que podemos encontrarnos cada día cuando comemos una rebanada de pan o cuando bebemos una botella de cerveza. El nombre científico de este organismo modelo es Saccharomyces cerevisiae, pero generalmente lo conocemos por su nombre común de “levadura de cerveza”. Nosotros le llamaremos simplemente levadura.

Aunque la levadura es un organismo unicelular, se parece mucho a nosotros en una serie de aspectos fundamentales. Tiene un núcleo en su célula (las bacterias no lo tienen) y contiene muchas de las mismas proteínas y sustancias químicas que en organismos superiores como los mamíferos.

Debido a que las levaduras son organismos simples, es muy fácil trabajar con ellos experimentalmente. Una célula (madre) de levadura puede generar nuevas células (hijas) de una forma relativamente sencilla. La célula madre copia su ADN. Una nueva célula brota de la célula madre. Esta célula hija contiene la cantidad correcta de ADN; se desprende de la célula madre y actúa como un nuevo organismo unicelular completamente independiente. La levadura se divide para formar nuevas células de una forma realmente rápida, lo que significa que pueden hacerse experimentos en unas pocas semanas en vez de en los meses o años que se requieren en el caso de algunos organismos superiores, y especialmente en el de los mamíferos. Las levaduras

pueden crecer en una sopa líquida o en una placa de Petri, lo que las hace muy fáciles de manejar. También es bastante sencillo crear mutaciones en genes interesantes.

La levadura tiene una propiedad específica que la ha convertido en uno de los sistemas modelo favoritos de los epigenetistas. La levadura nunca metila su ADN, por lo que todos los efectos epigenéticos tienen que estar causados por modificaciones de las histonas. Hay otra propiedad útil de la levadura. Cada vez que una célula madre de levadura da lugar a una célula hija, esta deja una cicatriz en la madre. Esto hace realmente fácil calcular cuántas veces se ha dividido una célula. Hay dos tipos de envejecimiento en las levaduras y cada uno de ellos tiene su equivalente en el envejecimiento humano, como podemos ver en la figura 13.2.

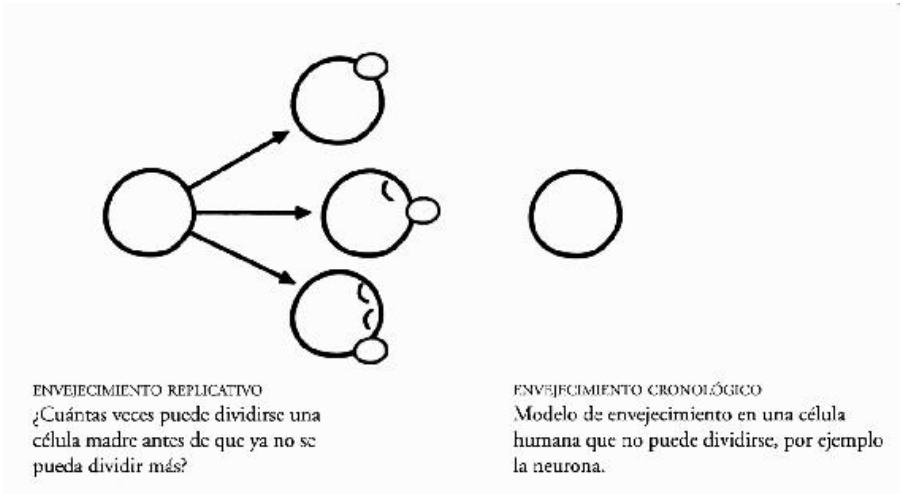

Figura 13.2: Los dos modelos de envejecimiento en la levadura, relevantes para las células que se dividen y para las que no se dividen.

La mayor parte del énfasis en la investigación del envejecimiento se ha puesto en el envejecimiento replicativo y en tratar de entender por qué las células pierden su capacidad de dividirse. El envejecimiento replicativo en los mamíferos está claramente relacionado con algunos de los síntomas más obvios del proceso de envejecer. Por ejemplo, los músculos esqueléticos contienen unas células madre especializadas llamadas células satélite. Estas solo pueden dividirse un cierto número de veces. Y una vez alcanzado este número ya no pueden crear nuevas fibras musculares.

Se han hecho progresos considerables en la comprensión del envejecimiento replicativo en la levadura. Una de las enzimas clave en el control de este proceso es una proteína epigenética llamada Sir2. Afecta al envejecimiento replicativo en la levadura por medio de dos caminos diferentes. Uno de estos caminos parece ser específico de la levadura, y el otro se encuentra en numerosas especies de todo el árbol evolutivo, incluidos los humanos.

Sir2 es una deacetilasa de histona. La levadura mutante que sobre-expresa Sir2 tiene una vida replicativa que es al menos un 30 por ciento más larga de lo normal[8]. Inversamente, la levadura que no expresa Sir2 tiene una duración de vida reducida[9], un cincuenta por ciento más corta de lo normal. El año 2009 la profesora Shelley Berger, una científica increíblemente dinámica de la Universidad de Pennsylvania, cuyo equipo ha sido muy influyente en el campo de la epigenética molecular, publicó los resultados de una serie de experimentos genéticos y moleculares realmente elegantes sobre la levadura.

Estos experimentos demostraron que la proteína Sir2 influye en el

envejecimiento quitando grupos acetilo de las proteínas histonas, y no mediante ningún otro de los roles que puede desempeñar esta enzima[10]. Este fue un experimento clave, porque Sir2, como muchas deacetilasas de histona, tiene una moral más bien laxa. No solo quita grupos acetilo de las histonas, sino también de por lo menos otras 60 proteínas de la célula. Muchas de estas proteínas no tienen nada que ver con la cromatina o con la expresión de los genes. El trabajo de Shelley Berger fue crucial para demostrar que Sir2 influye en el envejecimiento precisamente debido a sus efectos en las histonas. La alteración del patrón epigenético de las histonas influye a su vez en la expresión de los genes.

Estos datos, al poner de manifiesto que las modificaciones epigenéticas de las histonas, tienen realmente una gran influencia en el envejecimiento, convencieron a los científicos que trabajaban en este campo de que estaban en el buen camino. La importancia de Sir2 no parece estar restringida a la levadura. Si se sobre-expresa Sir2 en nuestro gusano favorito, C. elegans[11], el gusano vive más tiempo. Las moscas de la fruta que sobre-expresaban Sir2 vivían un 57 por ciento más de lo normal[12]. ¿Cuál es, pues, la importancia de este gen en el envejecimiento humano?

Hay siete versiones del gen Sir2 en los mamíferos, que han sido bautizados como SIRT1, SIRT2… hasta SIRT7. La mayor parte de la atención en el campo de los humanos se ha centrado en SIRT6, una curiosa deacetilasa de histona. Los principales avances en este campo se han producido en el laboratorio de Katrin Chua, una joven profesora en el Stanford Center que estudia la longevidad (y que es hermana de Amy Chua, autora de un obra muy polémica sobre la maternidad titulada Battle Hymn of the Tiger Mother).

Katrin Chua creó ratones que nunca expresaban ninguna proteína Sirt6, ni siquiera durante el desarrollo (estos ratones son los Sirt6 knockout). Estos animales parecían normales en el momento de nacer, aunque eran más bien pequeños. Pero a partir de las dos semanas desarrollaban una serie de síntomas propios del proceso de envejecimiento, como pérdida de grasa subcutánea, curvatura de la espina dorsal y déficits metabólicos. Los ratones morían al alcanzar un mes de edad, pese a que los ratones normales de laboratorio viven unos dos años.

La mayoría de las deacetilasas de histona son muy promiscuas. Pero esto significa que deacetilarán cualquier histona acetilada con la que se encuentren. De hecho, como hemos dicho más arriba, muchas ni siquiera se limitan a las histonas y quitan grupos acetilo de toda clase de proteínas. Sin embargo, SIRT6 no es así. SIRT6 solo quitan grupos acetilo de dos aminoácidos específicos –la lisina 9 y la lisina 56, ambas en la histona H3. La enzima también parece tener una

preferencia por las histonas que están posicionadas en los telómeros. Cuando Katrin Chua desactivó el gen SIRT6 en células humanas, encontró que los telómeros de estas células resultaban dañados y que los cromosomas empezaban a juntarse. Las células perdieron la capacidad de seguir dividiéndose y cesaron casi completamente su actividad[13].

Esto sugirió que las células humanas necesitan SIRT6 para mantener en buen estado las estructuras de los telómeros. Pero este no era el único papel de la proteína SIRT6. La acetilación de la histona 3 en el aminoácido 9 está asociada con la expresión del gen. Cuando SIRT6 quita esta modificación, este aminoácido puede ser metilado por otras enzimas presentes en la célula. La metilación en esta posición de la histona está asociada con la represión del gen. Katrin Chua realizó nuevos experimentos que confirmaron que cambiando los niveles de expresión de SIRT6 cambiaba la expresión de unos genes determinados.

SIRT6 se dirige a unos genes específicos formando un complejo con una proteína determinada. Una vez presente en estos genes, SIRT6 participa en un bucle retroactivo que contribuye a reducir la expresión del gen, en un ejemplo clásico de círculo vicioso. Cuando el gen SIRT6 es desactivado, los niveles de acetilación de las histonas en estos genes siguen siendo altos porque el bucle retroactivo no puede activarse. Esto aumenta la expresión de estos genes objetivo en los ratones SIRT6 knockout. Los genes-objetivo son los que promueven la autodestrucción o la entrada de las células en un estado de estasis permanente conocido como senescencia. Este efecto explica por qué la desactivación de SIRT6 está asociada con el envejecimiento prematuro[14]. Ello es debido a que los genes que aceleran los procesos asociados con el envejecimiento son activados demasiado pronto o demasiado vigorosamente, a una edad temprana.

Es como un pícaro fabricante que instalase un mecanismo de obsolescencia en el producto por él fabricado. Normalmente, el mecanismo no se pone en marcha durante un cierto número de años, porque si la obsolescencia se activa demasiado pronto, el fabricante se gana la reputación de fabricar productos de mala calidad y nadie se los compra. “Noquear” el gen SIRT6 en las células es un poco como el software malicioso que activa el mecanismo de la obsolescencia al cabo de un mes y no al cabo de un par de años.

Otros genes objetivo SIRT6 están asociados con la provocación de respuestas inflamatorias o inmunológicas. Esto también es relevante para el caso del envejecimiento, porque algunos achaques que se vuelven mucho más comunes con el paso del tiempo son el resultado de un aumento en la activación de estos caminos moleculares. Entre estos achaques se incluyen determinados problemas del sistema

cardiovascular y dolencias crónicas como la artritis reumatoide.

Hay una enfermedad genética rara llamada síndrome de Werner. Los pacientes que sufren este trastorno envejecen más deprisa y antes que los individuos sanos. La enfermedad la causan unas mutaciones en un gen implicado en la estructura tridimensional del ADN, que le confiere la configuración correcta y el grado adecuado de tensión para cada tipo específico de célula[15]. La proteína normal se une a los telómeros. Se une más eficazmente cuando las histonas en los telómeros han perdido el grupo acetilo en el aminoácido 9 de la histona 3. Esta es la modificación precisa quitada por la enzima SIRT6. Esto refuerza aún más el argumento a favor de un papel de SIRT6 en el control del envejecimiento[16].

Dado que SIRT6 es una deacetilasa de histona, puede ser interesante estudiar el efecto que tiene un inhibidor de las deacetilasas de histona en el envejecimiento. Podríamos predecir que produciría el mismo efecto que desactivar la expresión de la enzima SIRT6, es decir, aceleraría el envejecimiento. Esto debería hacernos reflexionar cuando planeamos tratar a un paciente con un inhibidor de las deacetilasas de histona como el SAHA. Al fin y al cabo, una droga anticancerígena que te hace envejecer más rápido no es una idea tan atractiva.

Afortunadamente, desde el punto de vista de tratar a los pacientes de cáncer, SIRT6 pertenece a una clase especial de enzimas deacetilasas de histona llamadas sirtuinas. A diferencia de las enzimas que encontramos en el capítulo 11, las sirtuinas no se ven afectadas por el SAHA ni por ninguna de las otras drogas inhibidoras de las deacetilasas de histona.

Coma menos, viva más

Todo esto pasa por alto la cuestión de si estamos más cerca o no de poder ofrecer a la gente una píldora para aumentar la longevidad. Los datos más recientes no parecen muy prometedores, especialmente si es cierto que muchos de los mecanismos básicos del envejecimiento son defensas contra el cáncer. No tiene mucho sentido desarrollar terapias que nos permitan vivir 50 años más si van a producirnos tumores que nos maten en menos de cinco. Hay, sin embargo, una forma de aumentar la duración de la vida que ha demostrado ser sumamente efectiva, tanto en la levadura como en la mosca de la fruta, tanto en los gusanos como en los mamíferos. Es la restricción calórica.

Si damos a un roedor solo el 60 por ciento de las calorías que ingeriría de tener libre acceso a la comida, esto tiene un impacto espectacular en la longevidad y en el desarrollo de enfermedades

relacionadas con la edad[17]. Para que surta algún efecto, la ingesta limitada de calorías tiene que empezar pronto y continuar durante toda la vida. En el caso de la levadura, reduciendo la cantidad de glucosa (alimento) en un cultivo desde un 2 a un 0,5 por ciento amplió la duración de la vida en un 30 por ciento aproximadamente.

Se ha debatido si este efecto de la restricción calórica está o no mediado por las sirtuinas, como Sir2 en la levadura o las versiones de Sir2 existentes en otros animales. Sir2 es regulada en parte por una sustancia química cuyos niveles se ven afectados por la cantidad de nutrientes disponible para las células. Es por ello que algunos autores han sugerido que estas dos cosas pueden estar relacionadas, y es una hipótesis muy atractiva[18]. No cabe ninguna duda que Sir2 es importante para la longevidad. La restricción calórica es también muy importante. La cuestión es si una y otra actúan juntas o por separado. De momento no hay consenso en esto, y los descubrimientos experimentales se ven muy influidos por el sistema modelo utilizado. Esto puede afectar a detalles que a primera vista pueden parecer triviales, como el tipo de levadura utilizado o la cantidad exacta de glucosa que contiene el cultivo.

La cuestión de cómo funciona la restricción calórica parece mucho menos importante que el hecho de que efectivamente funcione. Pero el mecanismo tiene una importancia enorme si lo que buscamos es una estrategia antienvejecimiento, porque la restricción calórica tiene limitaciones severas en el caso de los humanos. Lo que comemos tiene unas connotaciones sociales y culturales muy importantes para nosotros; no es un simple combustible. Además de estos aspectos psicológicos y sociológicos, la restricción calórica tiene efectos secundarios. Los más obvios son la reducción de la masa muscular y la pérdida de la libido. No tiene nada de sorprendente que cuando ofrecemos a alguien la posibilidad de vivir más pero con estos efectos secundarios, encuentre la idea poco atractiva[19].

Por este motivo, un trabajo publicado el año 2006 en la revista Nature, sobre una investigación dirigida por David Sinclair de la Harvard Medical School, causó una gran sensación. Los científicos estudiaron los efectos de un compuesto llamado resveratrol en la salud y la supervivencia de los ratones. El resveratrol es un compuesto complejo sintetizado a partir de unas plantas, entre ellas un tipo de uva. Es uno de los componentes del vino tinto. En el momento de la publicación del trabajo de Sinclair se había comprobado que el resveratrol ampliaba la vida de la levadura, de C. elegans y de la mosca de la fruta[20, 21].

El profesor Sinclair y sus colegas criaron ratones con una dieta hipercalórica y les suministraron resveratrol durante seis meses. Al final de este período de seis meses, analizaron los resultados en los

diversos grupos de ratones. Todos los que habían sido alimentados con una dieta hipercalórica estaban gordos, independientemente de si habían sido tratados o no con resveratrol. Pero los ratones que habían sido tratados con resveratrol estaban más sanos que los que no lo habían sido. Tenían menos grasa en el hígado, más habilidades motoras y menos síntomas de diabetes. A las 114 semanas, los ratones tratados con resveratrol tenían una tasa de mortalidad un 31 por ciento inferior a la de los animales no tratados pero alimentados con la misma dieta[22].

Podemos ver inmediatamente por qué este trabajo despertó tanto interés. Si pudieran obtenerse los mismos efectos en humanos, el resveratrol sería una especie de salvoconducto contra la obesidad. Coma lo que quiera, engorde tanto como desee y viva igualmente una vida larga y sana. No hace falta que deje en el plato la tercera parte de cada comida ni que pierda masa muscular o se quede sin su libido.

¿Cómo hace esto el resveratrol? Un trabajo anterior del mismo grupo había puesto de manifiesto que el resveratrol activaba una proteína sirtuina, en este caso el Sirt1[23]. Se cree que Sirt1 es importante para el control del metabolismo del azúcar y las grasas.

El profesor Sinclair fundó una empresa llamada Sirtris Pharmaceuticals, que continuó fabricando nuevos compuestos basados en la estructura del resveratrol. El año 2008 GlaxoSmithKline pagó 720 millones de dólares por Sirtris Pharmaceuticals para tener acceso a su experiencia y a su cartera de compuestos para tratar enfermedades relacionadas con el envejecimiento.

Esta compra fue considerada cara por muchos comentaristas económicos, y el hecho es que ha tenido problemas. El año 2009 un grupo de la compañía farmacéutica rival Amgen publicó un artículo en el que se sostenía que el resveratrol no activaba Sirt1, y que los hallazgos originales constituían un artefacto causado por problemas técnicos[24]. Poco después, unos científicos de Pfizer, otro gigante farmacéutico, publicó hallazgos muy similares a los de Amgen[25].

Es realmente insólito que las grandes compañías farmacéuticas publiquen trabajos que simplemente contradigan los descubrimientos de otra compañía. No ganan nada con ello. Las compañías farmacéuticas son juzgadas en definitiva por los fármacos que consiguen lanzar con éxito, y criticar a un competidor en las primeras fases de un programa de descubrimiento de un fármaco no les proporciona ninguna ventaja comercial. El hecho de que tanto Amgen como Pfizer publicasen sus descubrimientos es una demostración de lo polémica que se había vuelto la cuestión del resveratrol.

¿Importa cómo funciona el resveratrol? ¿No es lo más importante el hecho de que surta un efecto tan espectacular? Si uno está tratando de desarrollar un nuevo fármaco para tratar enfermedades humanas, es

muy importante. Las autoridades que autorizan nuevos fármacos son mucho más propensas a hacerlo cuando saben cómo funcionan. Esto se debe a que de este modo es mucho más fácil controlar los efectos secundarios y desarrollar nuevas teorías sobre dónde buscar. Pero otra cuestión es que probablemente el propio resveratrol no es en sí mismo el compuesto ideal para utilizarlo como fármaco.

Este es a menudo un problema con productos naturales como el resveratrol, extraídos de una planta. Los compuestos naturales pueden tener que ser modificados en mayor o menor medida para que circulen bien por el cuerpo y para que no produzcan efectos secundarios indeseables. La artemisinina, por ejemplo, es una sustancia química derivada del ajenjo (Artemisia absinthium) que puede matar a los parásitos de la malaria. La propia artemisinina no es bien absorbida por el cuerpo humano, por lo que los investigadores tuvieron que desarrollar compuestos que fuesen variantes de la estructura química del producto natural original. Estas variantes matan a los parásitos de la malaria, pero son absorbidas por nuestros cuerpos mucho mejor que la artemisinina[26].

Pero si no sabemos cómo funciona exactamente un compuesto determinado, es muy difícil diseñar y poner a prueba nuevos productos, porque no sabemos cómo comprobar si los nuevos compuestos siguen afectando a la proteína adecuada.

GlaxoSmithKline sigue con sus programas con la sirtuina, pero en un preocupante desarrollo para la compañía han interrumpido los análisis clínicos de una formulación especial del resveratrol en una enfermedad llamada mieloma múltiple debido a problemas con la toxicidad renal[27].

Los progresos con los activadores de la deacetilasa de la histona sirtuina tienen un gran interés para los grandes protagonistas de la industria farmacéutica. Todavía no sabemos si estos modificadores epigenéticos marcarán la agenda, o serán el fin del desarrollo de terapias específicamente pensadas para aumentar la longevidad y combatir el envejecimiento. Así que, de momento, seguimos apegados a las viejas rutinas: mucha verdura, mucho ejercicio y procurar no tomar el sol en exceso.

1. http://www.isaps.org/upload/news_pdf/Raw_data_Survey2009.pdf
2. Aubert and Lansdorp (2008), Physiological Reviews 88: 557-579.
3. Para una reseña de este y de otros estudios sobre las actitudes públicas ante la extensión de la vida, véase Partridge et al. (2010), EMBO Reports 11: 735-737.
4. Bjornsson et al. (2008), Journal of the American Medical Association 200: 2.877-2.883.
5. Gaudet et al. (2003), Science 300: 488-492.
6. Eden et al. (2003), Science 300: 455.

7. Para una reseña útil de los cambios en las modificaciones epigenéticas durante el envejecimiento, véase Calvanese et al. (2009), Ageing Research Reviews 8: 269-276.
8. Kennedy et al. (1995), Cell 80: 485-496.
9. Kaeberlein et al. (1999), Genes and Development 13: 2.570-2.580.
10. Dang et al. (2009), Nature 459: 802-807.
11. Tissenbaum and Guarantee (2001), Nature 410: 227-230.
12. Rogina and Helfand (2004), Proceedings of the National Academy of Sciences USA 101: 15.998-16.003.
13. Michishita et al. (2008), Nature 452: 492-496.
14. Kawahara et al. (2009), Cell 136: 62-74.
15. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/277700
16. Michishita et al. (2008), Nature 452: 492-496.
17. McCay et al. (1935), Nutrition 5: 155-71.
18. Kaeberlein and Powers (2007), Ageing Research Reviews 6: 128-140.
19. Partridge at al. (2010), EMBO Reports 11: 735-737.
20. Howitz et al. (2003), Nature 425: 191-196.
21. Wood et al. (2004), Nature 430: 686-689.
22. Baur et al. (2006), Nature 444: 337-342.
23. Howitz et al. (2003), Nature 425: 191-196.
24. Beher et al. (2009), Chem Biol Drug Des. 74: 619-24.
25. Pacholec et al. (2010), J Biol Chem 285: 8.340-51.
26. Para una reseña, véase Chaturvedi et al. (2010), Chem Soc Rev. 39: 435-54.
27. http://www.fiercebiotech.com/story/weak-efficacy-renal-risks-force-gsk-dump-resveratrol-programm/2010-12-01

Capítulo 14
Larga vida a la reina

Todo lo que tengo por un poco de tiempo.
Frase atribuida a la reina **Isabel I de Inglaterra**

Los efectos de la nutrición en la salud y la esperanza de vida de los mamíferos son espectaculares. Como vimos en el capítulo anterior, la restricción calórica prolongada puede aumentar hasta un 30 por ciento la esperanza de vida de un ratón[1]. También vimos en el capítulo 6 que nuestra salud y longevidad pueden verse afectadas por la forma en que comieron nuestros padres y nuestros abuelos. Estos son descubrimientos bastante sorprendentes, pero la naturaleza nos ha proporcionado un ejemplo mucho más espectacular del impacto que tiene la dieta en la esperanza de vida. Imagínese, si puede, un régimen dietético que significa que un grupo selecto de una especie tiene una esperanza de vida veinte veces mayor que la de la mayoría de sus congéneres. Veinte veces mayor. Si esto fuese aplicable a los humanos, el Reino Unido todavía estaría gobernado por la reina Isabel I y lo seguiría estando otros 400 años.

Obviamente, esto no se da en los humanos, pero sí en un organismo común. Es una criatura con la que nos encontramos cada primavera y cada verano. Utilizamos un producto de sus esfuerzos para hacer velas y abrillantador de suelos y muebles, y nos hemos comido el otro, obtenido con mucho esfuerzo, desde el comienzo mismo de la historia humana. Estoy hablando de la abeja.

La abeja (Apis mellifera) es una criatura realmente extraordinaria. Es un ejemplo excelente de insecto social. Vive en colonias que pueden contener decenas de miles de individuos. La inmensa mayoría de ellas son trabajadoras. Son hembras estériles, que desempeñan varios papeles especializados como recoger polen, construir colmenas y cuidar de las crías. Hay un pequeño número de machos, que hacen poca cosa más que aparearse, si tienen suerte. Y luego está la reina.

En la formación de una nueva colonia, una reina virgen abandona una colmena acompañada de un enjambre de trabajadoras. Se aparea con unos cuantos machos y luego monta una nueva colonia. La reina pondrá miles de huevos, la mayoría de los cuales eclosionarán y de ellos saldrán más obreras. De algunos de los huevos saldrán nuevas reinas, que volverán a comenzar de nuevo todo el ciclo.

Dado que la reina fundadora de la colonia se apareó varias veces, no todas las abejas de la colonia serán genéticamente idénticas, porque

algunas tendrán padres diferentes. Pero habrá grupos de miles y miles de abejas genéticamente idénticas en cada colonia. Esta identidad genética no se refiere solo a las abejas obreras. Las nuevas reinas son genéticamente idénticas a miles de obreras de la colonia. Podemos llamarlas hermanas, pero esto no las describe del todo bien. Todas son clones.

Sin embargo, una nueva reina y sus hermanas clónicas obreras son increíblemente diferentes entre sí, tanto en su forma física como en su comportamiento y actividades. La reina puede ser el doble de grande que una obrera. Tras el denominado vuelo nupcial, la primera vez que abandona una colonia y se aparea, la reina casi nunca vuelve a salir de la colmena. Permanece en la oscuridad de su interior poniendo hasta 2.000 huevos al día durante los meses de verano. No tiene aguijón ni glándulas ceríferas ni bolsas para el polen (no tiene demasiado sentido tener una bolsa de la compra si nunca sales de casa). Las abejas obreras tienen una esperanza de vida que normalmente puede medirse por semanas, mientras que las reinas viven varios años[2].

Inversamente, las obreras pueden hacer muchas cosas que las reinas no pueden hacer. Una de las principales es localizar comida y decirle luego al resto de la colonia dónde está. Esta información la comunica utilizando la famosa "danza de las abejas". La reina vive rodeada de lujo, pero nunca sale a menear el esqueleto.

Así pues, una colonia de abejas contiene miles de individuos que son genéticamente idénticos, pero unos cuantos de ellos son realmente diferentes física y comportamentalmente. Esta diferencia en resultado se debe a cómo son alimentadas las larvas. El patrón de alimentación temprano determina completamente si una larva se convertirá en una obrera o en una reina.

En las abejas el guión del ADN es constante pero el resultado es variable. El resultado lo controla un acontecimiento temprano (el patrón de alimentación) que define un fenotipo que se mantiene durante el resto de la vida de la abeja. Este es un escenario que pide a gritos la intervención de la epigenética, y durante los últimos años los científicos han empezado a desentrañar los fenómenos moleculares que apuntalan este proceso.

La tirada de dados crítica para las abejas se produce el tercer día de su vida, cuando son apenas unas larvas casi inmóviles. Hasta el tercer día todas las larvas de abeja reciben la misma comida. Esta comida es una sustancia llamada jalea real, que produce un grupo especializado de obreras. Estas obreras jóvenes se conocen como abejas nodrizas y secretan la jalea real de unas glándulas que tienen en la cabeza. La jalea real es un alimento muy nutritivo. Es un concentrado de diferentes componentes muy distintos, incluidos algunos aminoácidos, algunas grasas, proteínas, vitaminas y otros nutrientes que aún no han

sido totalmente caracterizados.

Una vez que las larvas han vivido tres días, las abejas nodrizas dejan de administrar jalea real a la mayoría de ellas, que pasan a recibir una dieta de polen y néctar. Estas son las larvas de las que saldrán las abejas obreras.

Pero por razones que nadie entiende realmente, las abejas nodrizas continúan dando jalea real a un grupo selecto de larvas. No sabemos cómo ni por qué son elegidas estas larvas y no otras. Genéticamente son idénticas a las que pasan a ser alimentadas con una dieta menos sofisticada. Pero este pequeño grupo de larvas que continúan siendo alimentadas con jalea real crecen y se convierten en reinas, y serán alimentadas con esta misma sustancia durante toda su vida. La jalea real es esencial para la producción de ovarios maduros en las reinas. Las hembras obreras nunca desarrollan unos ovarios correctos, y es por esto, entre otros motivos, que son estériles. La jalea real también impide a la reina desarrollar los órganos que nunca va a necesitar, como las cestas del polen.

Entendemos algunos de los mecanismos que están detrás de este proceso. Las larvas de abeja contienen un órgano que desempeña algunas de las mismas funciones que nuestro hígado. Cuando una larva recibe jalea real continuamente, este órgano procesa el complejo alimento y activa la senda de la insulina. Esto es muy parecido a la senda hormonal en los mamíferos que controla los niveles de azúcar en la sangre. En las abejas la activación de esta senda incrementa la producción de otra hormona llamada Hormona Juvenil. La Hormona Juvenil, a su vez, activa otros circuitos moleculares. Algunos de estos estimulan el crecimiento y el desarrollo de tejidos como los ovarios en maduración. Otros interrumpen la producción de los órganos que la reina no va a necesitar[3].

Imitando a la realeza

Debido a que la maduración de las abejas tiene tantas de las características de un fenómeno epigenético, los investigadores especularon que en ella estaría seguramente implicada la maquinaria epigenética. Los primeros indicios de que este es el caso se produjeron en el 2006. Este año los investigadores secuenciaron el genoma de esta especie para identificar el programa genético fundamental[4]. Su investigación puso de manifiesto que el genoma de la abeja contenía genes muy parecidos a los genes de la ADN metiltransferasa de organismos superiores como los vertebrados. Se vio igualmente que el genoma de las abejas también contenía muchos grupos CpG. Esta es

una secuencia de dos nucleótidos que es normalmente el objetivo de las ADN metiltransferasas.

Ese mismo año, un grupo dirigido por Gene Robinson en Illinois mostró que las proteínas de la ADN metiltransferasa codificadas en el genoma de la abeja estaban activadas. Las proteínas podían añadir grupos metilo al residuo de citosina en un motivo CpG del ADN[5]. Las abejas también expresaban proteínas que podían unirse al ADN metilado. Juntos, estos datos mostraron que las células de las abejas podían tanto "escribir" como "leer" un código epigenético.

Hasta que estos datos fueron publicados, nadie había querido realmente conjeturar si las abejas poseían o no un sistema de metilación del ADN. Esto era porque el sistema experimental más utilizado entre los insectos, la mosca de la fruta Drosophila melanogaster, que ya hemos encontrado anteriormente en este libro, no metila su ADN.

Es interesante descubrir que las abejas tienen un sistema de metilación del ADN intacto. Pero esto no demuestra que la metilación del ADN esté implicada en las respuestas a la jalea real, o los efectos persistentes de este alimento en la forma física y en el comportamiento de las abejas adultas. Este tema lo abordó de forma muy elegante el laboratorio del doctor Ryszard Maleszka en la Universidad Nacional de Australia en Canberra.

El doctor Maleszka y sus colegas bloquearon la expresión de una de las ADN metiltransferasas en las larvas de las abejas desactivando el gen Dnmt3. Dnmt3 es responsable de añadir grupos metilo a las regiones del ADN que no han sido metiladas antes. Los resultados de este experimento se muestran en la figura 14.1.

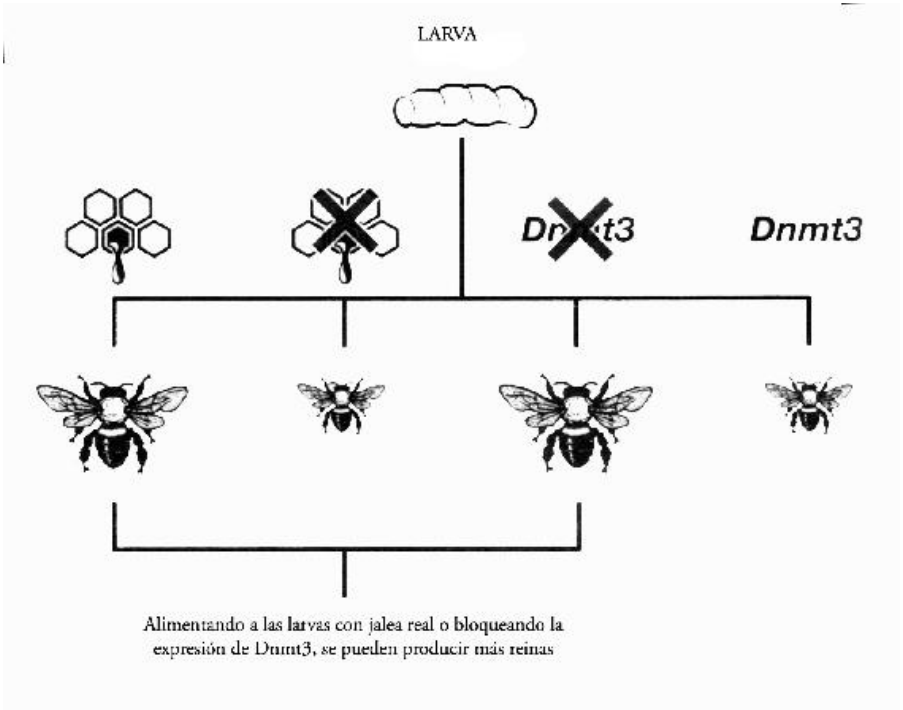

Figura 14.1: Cuando se da jalea real a las larvas de abeja durante largos períodos, las larvas se convierten en reinas. El mismo efecto puede darse en ausencia de una alimentación prolongada con jalea real si se reduce experimentalmente la expresión del gen Dnmt3. La proteína Dnmt3 se reduce experimentalmente en las larvas. La proteína Dnmt3 añade grupos metilo al ADN.

Cuando los científicos redujeron la expresión de Dnmt3 en las larvas de abeja los resultados fueron los mismos que si hubiesen sido alimentadas con jalea real. La mayor parte de las larvas maduraron como reinas y no como obreras. Debido a que el bloqueo de Dnmt3 surtía el mismo efecto que alimentar a las larvas con jalea real, esto sugería que uno de los principales efectos de la jalea real está conectado con alteraciones de los patrones de metilación del ADN en genes importantes[6].

Para verificar esta hipótesis, los investigadores también examinaron los patrones reales de metilación del ADN y de expresión de los genes en los diferentes grupos experimentales de abejas. Mostraron que los cerebros de las reinas y los de las obreras tenían unos patrones de metilación del ADN diferentes. Los patrones de metilación del ADN en las abejas a las que se les había bloqueado Dnmt3 eran muy similares a las de las reinas que siendo larvas habían sido alimentadas con jalea real. Esto era lo que cabía esperar dada la similitud de fenotipos en uno y otro grupo. Los patrones de expresión genética en las abejas normales y en las abejas con el gen Dnmt3 bloqueado eran también muy similares. Los autores concluyeron que los efectos nutricionales

de alimentar de manera continuada a las larvas con jalea real se produjeron a través de la metilación del ADN.

Hay todavía muchas lagunas en nuestra comprensión de cómo la nutrición en las larvas de abeja resulta en la alteración de los patrones de metilación del ADN. Una hipótesis, basada en los experimentos arriba mencionados, es que la jalea real inhibe la enzima ADN metiltransferasa. Pero hasta ahora nadie ha podido demostrar esto experimentalmente. Es por tanto posible que el efecto que tiene la jalea real en la metilación del ADN sea indirecto.

Lo que sabemos ahora es que la jalea real influye en las señales hormonales de las abejas, y que esto cambia los patrones de expresión de los genes. Los cambios en los niveles de expresión de un gen influyen en las modificaciones genéticas que tienen lugar en este gen. Cuanto más se activa un gen, más se modifican sus histonas en formas que promueven la expresión de los genes. Es posible que algo parecido ocurra en las abejas.

También sabemos que a menudo los sistemas de metilación del ADN y los sistemas de modificación de las histonas actúan conjuntamente. Esto ha despertado el interés en el papel de las enzimas modificadoras de las histonas en el control del desarrollo y el comportamiento de las abejas. Cuando se secuenció el genoma de la abeja se identificaron cuatro enzimas deacetilasas de histona. Esto era intrigante porque se sabía desde hacía tiempo que la jalea real contiene un compuesto llamado fenil butirato[7]. Esta pequeña molécula puede inhibir a las deacetilasas de histona, pero lo hace de un modo más bien débil. El año 2011, un grupo dirigido por el doctor Mark Bedford, del MD Anderson Cancer Center en Houston, publicó un interesante estudio sobre otro componente de la jalea real. Otro de los autores de este trabajo era el profesor Jean-Pierre Issa, que ha tenido una gran influencia al promover el uso de drogas epigenéticas para el tratamiento del cáncer.

Los investigadores analizaron un compuesto que se encuentra en la jalea real llamado ácido E-10-hidroxi-2-decenoico, o 10HDA. La estructura de este compuesto se muestra en la figura 14.2, junto con la del SAHA, el inhibidor de la deacetilasa de histona que vimos en el capítulo 11 que ha sido autorizado en el tratamiento del cáncer.

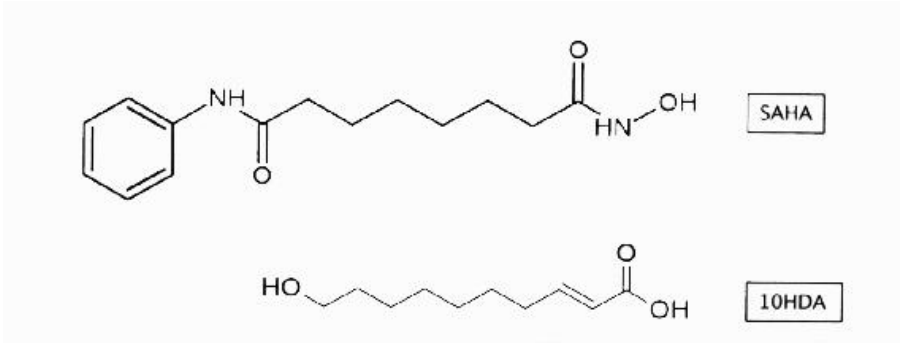

Figura 14.2: Estructura química del inhibidor de la deacetilasa de histona SAHA y de 10HDA, un compuesto que se encuentra en la jalea real. C: Carbono; H: Hidrógeno; N: Nitrogeno; O: Oxígeno. Para mayor simplicidad, algunos átomos de carbono no se muestran explícitamente, pero están presentes allí donde hay un enlace de dos líneas.

Las dos estructuras no son ni mucho menos idénticas, pero tienen algunas semejanzas. Ambas tienen una larga cadena de átomos de carbono (la parte que parece el dorso de un cocodrilo visto de perfil) y la parte derecha de los dos compuestos es también muy parecida. Mark Bedford y sus colegas formularon la hipótesis de que 10HDA era probablemente un inhibidor de las deacetilasas de histona. Llevaron a cabo una serie de ensayos y de experimentos con células y mostraron que la hipótesis era correcta. Esto significa que ahora sabemos que uno de los principales componentes encontrados en la jalea real inhibe a una clase clave de enzimas epigenéticas[8].

La abeja desmemoriada y el kit de herramientas flexible

La epigenética influye en más cosas que en si las larvas de abeja se convierten en obreras o en reinas. Ryszard Maleszka también ha mostrado que la metilación del ADN está implicada en cómo las abejas procesan los recuerdos. Cuando las abejas encuentran una buena fuente de polen o de néctar, regresan volando a la colmena y cuentan a los otros miembros de la colonia hacia donde tienen que ir para encontrar esas fuentes de alimento. Esto nos dice algo realmente importante acerca de las abejas: que pueden retener información. Pueden hacerlo o, si no, no podrían explicar a las otras abejas dónde encontrar comida. Naturalmente, es igualmente importante que las abejas puedan olvidar información y sustituirla con datos nuevos. No tiene sentido enviar a tus colegas obreras al lugar en el que floreció un montón de cardos la semana pasada, si mientras tanto se los ha comido un asno. La abeja necesita olvidar los cardos de la semana

pasada y recordar dónde está el espliego que ha visto esta semana.

Es realmente posible adiestrar a las abejas para responder a ciertos estímulos asociados con la comida. El doctor Maleszka y sus colegas mostraron que cuando las abejas reciben este adiestramiento, los niveles de la proteína Dnmt3 suben en aquellas partes del cerebro de las abejas que son importantes para el aprendizaje. Si las abejas son tratadas con una droga que inhibe la proteína Dnmt3, el compuesto altera la forma en que las abejas retienen los recuerdos, y también la velocidad a la que los olvidan[9].

Aunque sabemos que la metilación del ADN es importante en la memoria de las abejas, no sabemos exactamente cómo funciona. Esto se debe a que todavía no está claro qué genes son metilados cuando las abejas aprenden y adquieren nuevos recuerdos.

Hasta ahora, podíamos pensar que las abejas y los organismos superiores, incluidos nosotros y nuestros primos los mamíferos, utilizan la metilación del ADN de la misma forma. Es cierto que los cambios en la metilación del ADN están asociados con alteraciones en los procesos del desarrollo tanto en los humanos como en las abejas. También es cierto que tanto los mamíferos como las abejas utilizan la metilación del ADN en el cerebro durante el procesamiento de la memoria.

Pero curiosamente, las abejas y los mamíferos utilizan la metilación del ADN de formas muy diferentes. Un carpintero utiliza una sierra que tiene en su caja de herramientas para construir una estantería. Un cirujano ortopédico tiene una sierra en el carrito del instrumental y la utiliza para amputar una pierna. A veces, el mismo elemento de un kit puede utilizarse de formas muy diferentes. Tanto los mamíferos como las abejas utilizan la herramienta de la metilación del ADN, pero en el curso de la evolución la han empleado de formas muy diferentes.

Cuando los mamíferos metilan el ADN, normalmente metilan las regiones promotoras de los genes y no las partes que codifican aminoácidos. Los mamíferos también metilan elementos repetitivos del ADN y transposones, como vimos al estudiar el trabajo de Emma Whitelaw en el capítulo 5. La metilación del ADN en los mamíferos tiende a estar asociada con la desactivación de la expresión de los genes y con el bloqueo de elementos peligrosos como los transposones que de otro modo podrían causar problemas en nuestros genomas.

Las abejas utilizan la metilación del ADN de una forma completamente diferente. No metilan regiones repetitivas o transposones, de modo que presumiblemente tienen otras formas de controlar a estos elementos potencialmente problemáticos. Metilan motivos CpG en los fragmentos de genes que codifican aminoácidos y no en las regiones promotoras de los genes. Las abejas no utilizan la metilación del ADN para desactivar genes. En las abejas, la metilación

del ADN se encuentra en genes que se expresan en todos los tejidos y también en genes que tienden a ser expresados por insectos de especies muy diferentes. La metilación del ADN actúa como un mecanismo de ajuste fino en los tejidos de las abejas. Modula la actividad de los genes, subiendo o bajando levemente el dial del volumen en vez de utilizar un interruptor on/off[10]. Los patrones de metilación del ADN también están fuertemente correlacionados con el control del ensamblaje del ARN mensajero en los tejidos de las abejas. Sin embargo, desconocemos todavía cómo esta modificación epigenética influye realmente en la forma en que se procesa el mensaje[11].

En realidad estamos empezando a desentrañar las sutilezas de la regulación epigenética en las abejas. Por ejemplo, hay 10.000.000 de sitios CpG en el genoma de la abeja, pero menos del 1 por ciento de estos están metilados en un tejido dado. Desafortunadamente, este bajo grado de metilación dificulta el análisis de los efectos de esta modificación epigenética. Los efectos del "noqueo" de Dnmt3 muestran que la metilación del ADN es muy importante en el desarrollo de las abejas. Pero dado que la metilación del ADN es un mecanismo de ajuste fino en esta especie, es probable que el noqueo de Dnmt3 resulte en una serie de cambios individualmente poco importantes en un número relativamente grande de genes, más que unos cambios espectaculares en unos pocos genes. Este tipo de alteraciones sutiles son los más difíciles de analizar y de investigar experimentalmente.

Las abejas no son la única especie de insecto que ha desarrollado una sociedad compleja con diferentes formas y funciones para individuos genéticamente idénticos. Este modelo ha evolucionado independientemente varias veces, incluido en diferentes especies de avispas, termitas, abejas y hormigas. Todavía no sabemos si en todos estos casos se utilizan los mismos procesos epigenéticos. Shelley Berger, de la Universidad de Pennsylvania, cuya obra sobre el envejecimiento vimos en el capítulo 13, colabora en un gran proyecto centrado en la genética y la epigenética de las hormigas. Este trabajo ya ha puesto de manifiesto que al menos dos especies de hormigas también pueden metilar el ADN en sus genomas. La expresión de diferentes enzimas epigenéticas varía entre diferentes grupos sociales en las colonias[12]. Estos datos sugieren de modo tentativo que es posible que el control epigenético de los miembros de la colonia sea un mecanismo que ha evolucionado más de una vez en los insectos sociales.

Por ahora, sin embargo, la mayor parte del interés en el mundo exterior a los laboratorios de epigenética se centra en la jalea real, que tiene una larga historia como suplemento alimenticio sano. Vale la

pena destacar que hay muy pocas pruebas que respalden que la jalea real surta efectos importantes en los humanos. El ácido 10HDA, que Mark Bedford y sus colegas mostraron que era un inhibidor de las deacetilasas de histona, puede afectar al crecimiento de las células de los vasos sanguíneos[13]. Teóricamente, esto podría ser útil en el cáncer, ya que los tumores dependen de un buen aporte de sangre para seguir creciendo. Sin embargo, estamos muy lejos de poder demostrar que la jalea real puede ser realmente útil para combatir el cáncer o para ayudar de cualquier otro modo a la salud humana. Si hay algo que ya sabemos es que las abejas y los humanos no son epigenéticamente iguales, lo que no tiene nada de malo, a menos que uno sea muy partidario de la monarquía.

1. McCay et al. (1935), Nutrition 5: 155-71.
2. Para una reseña útil de las diferencias, véase Chittka and Chittka (2010), PLos Biology 8: e1000532.
3. Para un resumen útil de estos procesos, véase Maleszka(2008), Epigenetics 3: 188-192.
4. Honeybee Genome Sequencing Consortium (2006), Nature 443: 931-49.
5. Wang et al. (2006), Science 314: 645-647.
6. Kucharski et al. (2008), Science 319: 1.827-1.830.
7. Lyko et al. (2010), PLos Biology 8: e1000506.
8. Spannhoff et al. (2011), EMBO Reports 12: 238-243.
9. Lockett et al. (2010), NeuroReport 21: 812-816.
10. Hunt et al. (2010), Genome Biol Evol 2: 719-728.
11. Lyko et al. (2010), PLos Biology 8: e1000506.
12. Bonasio et al. (2010), Science 329: 1.068-1.071.
13. Izuta et al. (2009), Evid Based Complement Alternat Med 6: 489-494.

Capítulo 15
La revolución verde

Ver un mundo en un grano de arena,
Y un paraíso en una flor silvestre,
Tener el infinito en la palma de la mano
Y la eternidad en un instante.
William Blake

Probablemente todos conocemos el juego de adivinanzas "animal, vegetal o mineral". La suposición implícita en el nombre de este juego es que las plantas y los animales son completamente diferentes entre sí. Es cierto, ambos son organismos vivos, pero ahí es donde creemos que acaban las semejanzas. Es posible que podamos aceptar la idea de que en algún momento del oscuro pasado evolutivo, los humanos y los gusanos microscópicos compartieron un ancestro. Pero ¿con qué frecuencia nos preguntamos por la herencia biológica que compartimos con las plantas? ¿Cuándo pensamos en los claveles como en nuestros primos hermanos?

Y sin embargo, animales y plantas son sorprendentemente parecidos en muchos sentidos. Este es especialmente el caso cuando consideramos a los más avanzados de nuestros parientes verdes, las plantas con flor. Entre estas se incluyen las hierbas y los cereales de los que dependemos en gran medida para nuestro consumo básico de alimentos, y las plantas de hoja ancha, desde la col a los robles y desde el rododendro al berro.

Los animales y las plantas con flor son organismos multicelulares. Muchas de las células de estos organismos están especializadas para cumplir determinadas funciones. En las plantas con flor esto incluye células que transportan agua y azúcar por toda la planta, las células fotosintetizadoras de las hojas y las células almacenadoras de alimento de las raíces. Igual que los animales, las plantas tienen células especializadas responsables de la reproducción sexual. Los núcleos de los espermatozoides son transportados en el polen y fertilizan a una gran célula que finalmente da origen a un zigoto y a una nueva planta individual.

Las semejanzas entre plantas y animales son más fundamentales que estas características visibles. Hay muchos genes en las plantas que tienen su equivalente en los animales. De manera crucial para el tema que nos ocupa, las plantas también tienen un sistema epigenético muy

desarrollado. Pueden modificar las proteínas histonas y el ADN igual que las células animales, y en muchos casos utilizan enzimas epigenéticas muy similares a las utilizadas por los animales, incluidos los humanos.

Estas semejanzas genéticas y epigenéticas sugieren que los animales y las plantas tienen ancestros comunes. Debido a esta ascendencia común, hemos heredado una caja de herramientas genéticas y epigenéticas similar.

Naturalmente, también hay diferencias realmente importantes entre plantas y animales. Las plantas pueden crear su propia comida, y los animales no pueden hacerlo. Las plantas absorben sustancias químicas de su entorno, especialmente agua y dióxido de carbono. Utilizando energía solar las plantas pueden convertir estas sustancias químicas simples en azúcares complejos como la glucosa. Casi toda la vida en el planeta Tierra depende directa o indirectamente de este asombroso proceso de la fotosíntesis.

Hay otras dos formas en que las plantas y los animales son muy diferentes. La mayor parte de los jardineros saben que es posible coger un esqueje de una planta –tal vez un pequeño brote– y crear una nueva planta a partir del mismo. Hay muy pocos animales en los que esto es posible, y ciertamente ninguno de ellos es un animal superior. Es verdad que si determinada especie de lagarto pierde la cola, puede crecerle otra. Pero no es posible hacer lo contrario. No es posible generar un nuevo lagarto a partir de una cola.

Esto se debe a que en la mayoría de animales adultos las únicas células troncales genuinamente pluripotentes son las células fuertemente controladas de la línea germinal que dan lugar a los óvulos o a los espermatozoides. En cambio, las células troncales pluripotentes activas son una parte completamente normal de una planta. En las plantas estas células troncales pluripotentes se encuentran en los extremos del tallo y de las raíces. En las condiciones adecuadas, estas células pueden seguir dividiéndose para que la planta siga creciendo. Pero en otras circunstancias las células troncales se diferencian en tipos concretos de células, como las de las flores. Una vez que una de estas células ha entrado en la vía de convertirse en parte de un pétalo, por ejemplo, ya no puede volver atrás y ser de nuevo una célula del tallo. Incluso las células vegetales acaban bajando finalmente hasta el fondo del paisaje epigenético de Waddington.

La otra diferencia entre plantas y animales es bastante obvia. Las plantas no pueden moverse. Cuando las condiciones ambientales cambian, la planta tiene que adaptarse o morir. No pueden escapar de los climas desfavorables. Tienen que encontrar la forma de responder a las circunstancias ambientales en que se encuentran. Necesitan estar

seguras de que sobrevivirán lo suficiente para reproducirse en el momento adecuado del año, cuando sus retoños tengan más posibilidades de convertirse en nuevas plantas individuales.

Compárese esto con una especie como la golondrina europea (Hirundo rustica), que pasa el invierno en Sudáfrica. Cuando se acerca el verano y las condiciones se hacen insoportables, la golondrina inicia una emigración épica. Cruza África y Europa para pasar el verano en las islas Británicas, donde cría a sus polluelos. Seis meses más tarde, regresa a Sudáfrica.

Muchas de las respuestas de una planta a su entorno están relacionadas con los cambios en las células. Entre estos cambios están el dejar de ser una célula pluripotente para pasar a ser parte de una flor terminalmente diferenciada y poder proceder a la reproducción sexual. Los procesos epigenéticos desempeñan un papel importante en estos dos acontecimientos, e interactúan con otros procesos que se producen en las células para maximizar las posibilidades de éxito reproductivo.

No todas las plantas utilizan exactamente las mismas estrategias epigenéticas. El sistema modelo mejor caracterizado es una pequeña planta de flor de apariencia insignificante llamada Arabidopsis thaliana. Es un miembro de la familia de la mostaza y tiene el mismo aspecto anodino de cualquier otro hierbajo que podamos encontrar en un páramo. La mayor parte de sus hojas crecen cerca del suelo en forma de roseta. Produce unas pequeñas flores blancas en un tallo de unos 20-25 cm de alto. Es un sistema modelo muy útil para los investigadores porque su genoma es muy compacto, lo que facilita su secuenciación y la identificación de los genes. Existen también técnicas bien desarrolladas para modificar genéticamente a esta planta. Esto hace que a los científicos les resulte relativamente sencillo introducir mutaciones en los genes para investigar su función.

En la naturaleza, las semillas de Arabidopsis thaliana germinan normalmente a comienzos del verano. La planta crece creando la roseta de hojas. Esta es la fase vegetativa del crecimiento de la planta. Para producir retoños, Arabidopsis thaliana genera flores, y son unas estructuras de la flor las que generarán los nuevos óvulos y semillas que producirán eventualmente nuevos zigotos, que serán diseminados en las semillas.

Pero este es el problema que tiene la planta. Si florece a final de año, las semillas que produce se perderán, porque las condiciones climatológicas no serán las adecuadas para su germinación. Y aunque consigan germinar, las tiernas plantitas que se formen morirán seguramente al no poder resistir las duras condiciones climáticas como la escarcha.

La Arabidopsis thaliana adulta necesita mantener seca la pólvora.

Tiene muchas más probabilidades de que sobrevivan muchos de sus retoños si espera hasta la llegada de la primavera para florecer. La planta adulta puede sobrevivir inviernos que con toda seguridad acabarían con las plantas jóvenes. Esto es exactamente lo que hace Arabidopsis thaliana. La planta "espera" a que llegue la primavera y solo entonces produce flores.

Los ritos de la primavera

El término técnico que designa esto es vernalización. Vernalización significa que una planta tiene que experimentar un período prolongado de frío (normalmente, el invierno) antes de poder florecer. Esto es muy habitual en plantas con un ciclo de vida anual, especialmente en las regiones templadas de la tierra en las que las estaciones están bien definidas. La vernalización no afecta solamente a las plantas de hoja ancha como Arabidopsis thaliana. Muchos cereales también muestran este efecto, especialmente cultivos como la cebada y el trigo invernales. En muchos casos, el prolongado período de frío tiene que ir seguido de un incremento en la longitud del día para que se produzca la floración. La combinación de los dos estímulos asegura que la floración se produzca en el momento más apropiado del año.

La vernalización tiene algunas características muy importantes. Cuando la planta empieza a notar y a responder al frío, puede ser muchas semanas o meses antes de que empiece a florecer. La planta puede continuar creciendo vegetativamente a base de ir dividiendo sus células durante el período frío. Cuando se producen nuevas semillas, después de la vernalización de la planta madre, las semillas son "puestas a cero". Las nuevas plantas que salen de las semillas tendrán que pasar por su propia estación fría antes de florecer[1].

Estas características de la vernalización recuerdan los fenómenos epigenéticos en los animales. Concretamente:

1. La planta manifiesta cierta forma de memoria molecular, porque el estímulo y el evento final están separados por semanas o meses. Podemos comparar esto con las respuestas anormales al estrés en los roedores adultos que fueron "descuidados" de pequeños.

2. La memoria se mantiene incluso después de que las células se dividan. Podemos comparar esto con las células animales que siguen actuando de cierta forma después de un estímulo recibido por la célula madre, como en el desarrollo normal o en la progresión de un cáncer.

3. La memoria se pierde en la siguiente generación (las semillas). Esto es comparable con la forma en que la mayor parte de cambios

que se producen en los tejidos somáticos son “borrados” en los animales, de modo que la herencia lamarckiana es algo excepcional más que habitual.

Así, a un nivel fenomenológico, la vernalización parece muy epigenética. Recientemente varios laboratorios han confirmado que en la base de la misma hay unos procesos epigenéticos al nivel de la modificación de la cromatina.

El gen clave implicado en la vernalización se llama FLC (por las siglas de flowering locus C). FLC codifica una proteína llamada represor transcripcional. Esta proteína se une a otros genes e impide que sean activados. Hay tres genes que son particularmente importantes para la floración en Arabidopsis thaliana, llamados FT, SOCI y FD. La figura 15.1 muestra cómo FLC interactúa con estos genes y las consecuencias que ello tiene en la floración. También muestra cómo el estatus epigenético de FLC cambia después de un período de frío prolongado.

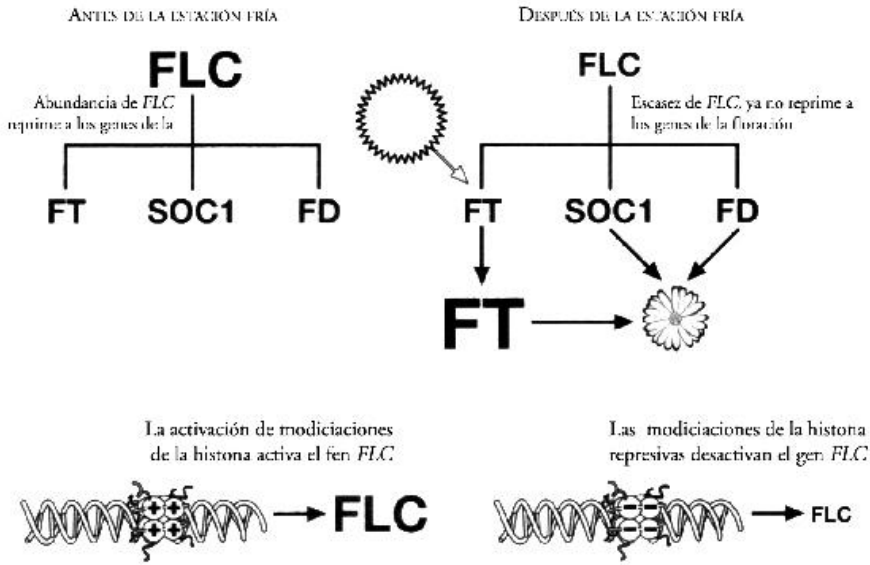

Figura 15.1: Determinadas modificaciones epigenéticas regulan la expresión del gen FLC, que reprime a los genes que promueven la floración. Las modificaciones epigenéticas en el gen FLC están controladas por la temperatura.

Antes de la llegada del invierno, el promotor del gen FLC lleva muchas modificaciones de la histona que activan la expresión del gen. Debido a ello, el gen FLC se expresa mucho y la proteína que codifica se une a los genes-objetivo y los reprime. Esto mantiene a la planta en su fase de crecimiento vegetativo normal. Pasado el invierno, las modificaciones de la histona en el promotor del gen FLC cambian a represivas y desactivan el gen FLC. Los niveles de la proteína FLC caen, lo que anula la represión de los genes-objetivo. Los períodos más largos de luz solar durante la primavera activan la expresión del gen FT. Es esencial que los niveles de FLC se hayan reducido en esta fase, porque si los niveles de FLC son elevados, el gen FT tiene dificultades para reaccionar al estímulo que representa la luz solar[2].

Experimentos con versiones mutadas de enzimas epigenéticas han puesto de manifiesto que los cambios en las modificaciones de la histona en el gen FLC son muy importantes para controlar la respuesta de la floración. Por ejemplo, hay un gen llamado SDG27 que añade grupos metilo al aminoácido lisina en la posición 4 de la histona H3, de modo que es un escritor epigenético. Esta metilación está asociada con la expresión del gen activo. El gen SDG27 puede ser mutado experimentalmente de modo que ya no codifique una proteína activa. Las plantas con esta mutación tienen menos modificaciones de la histona activas en el promotor del gen FLC. Producen menos proteína FLC y por tanto no son buenas reprimiendo a los genes que desencadenan la floración. Las plantas mutantes SDG27 florecen antes

que las plantas normales[3]. Esto demuestra que las modificaciones epigenéticas en el promotor FLC no reflejan simplemente los niveles de actividad del gen, sino que realmente alteran la expresión del mismo. Las modificaciones causan realmente el cambio en la expresión.

El clima frío induce en las células de las plantas una proteína llamada VIN3. Esta proteína puede ligarse al promotor FLC. VIN3 es un tipo de proteína llamado remodelador de la cromatina. Puede cambiar el nivel de cohesión de la cromatina haciéndola más accesible a otras proteínas. A menudo, abrir la cromatina lleva a un incremento en la expresión de los genes. Sin embargo, en este caso, VIN3 atrae a otra enzima que puede añadir grupos metilo a las histonas. Sin embargo, esta enzima particular añade grupos metilo al aminoácido lisina en la posición 27 de la histona H3. Esta modificación reprime la expresión del gen y es uno de los métodos más importantes que utiliza la planta para desactivar el gen FLC[4, 5].

Esto plantea la cuestión de cómo el clima frío produce cambios epigenéticos específicamente en el gen FLC. ¿Cuál es el mecanismo orientador? No conocemos todos los detalles, pero una de las fases ya ha sido esclarecida. Después de un período de clima frío, las células de Arabidopsis thaliana producen un ARN largo que no codifica proteína. Este ARN se llama COLDAIR. El ARN no codificante COLDAIR se encuentra concretamente en el gen FLC. Una vez localizado se une al complejo enzimático que crea la importante marca represiva en la posición 27 de la histona H3. COLDAIR, por tanto, actúa de mecanismo orientador para el complejo enzimático[6].

Cuando Arabidopsis thaliana produce nuevas semillas, las marcas represivas de la histona en el gen FLC son eliminadas y sustituidas por modificaciones que activan la cromatina. Esto garantiza que cuando la semilla germine el gen FLC será activado y reprimirá la floración hasta que la nueva planta haya dejado atrás el invierno.

De estos datos podemos inferir que las plantas con flor utilizan la misma maquinaria epigenética que muchas células animales. Entre esta maquinaria están las modificaciones de las histonas y el uso de ARN largo no codificante como objetivo de estas modificaciones. Es cierto que las células animales y las vegetales utilizan las mismas herramientas con finalidades diferentes –recuérdese el cirujano ortopédico y el carpintero del capítulo anterior–, pero esta es una buena prueba de la existencia de un ancestro común y de un mismo conjunto de herramientas.

Las similitudes epigenéticas entre plantas y animales no terminan aquí. Igual que los animales, las plantas producen miles de diferentes pequeñas moléculas de ARN. Estas no codifican proteínas, sino que silencian genes. Fueron unos científicos que trabajaban con plantas los

primeros en darse cuenta de que estas pequeñas moléculas de ARN pueden pasar de una célula a otra, silenciando sobre la marcha la expresión de los genes[7, 8]. Esto expande la respuesta epigenética a un impulso desde un lugar inicial a partes distantes del organismo.

El cereal kamikaze

La investigación con Arabidopsis thaliana ha puesto de manifiesto que las plantas utilizan modificaciones epigenéticas para regular miles de genes[9]. Esta regulación probablemente sirve a unos mismos propósitos que en las células animales. Ayuda a las células a mantener respuestas apropiadas pero a corto plazo a los estímulos medioambientales, y también encierra a las células diferenciadas en determinados patrones permanentes de expresión genética. Gracias a los mecanismos epigenéticos, nosotros los humanos no tenemos dientes en los ojos, y a las plantas no les crecen hojas en las raíces.

Las plantas con flor comparten un fenómeno epigenético característico con los mamíferos, que no tiene ningún otro miembro del reino animal. Las plantas con flor son los únicos organismos que conocemos, además de los mamíferos placentarios, en los que los genes llevan impronta. La impronta es el proceso que examinamos en el capítulo 8 según el cual el patrón de expresión de un gen depende de si ha sido heredado del padre o de la madre.

A simple vista, esta similitud entre las plantas con flor y los mamíferos parece muy extraña. Pero existe un paralelismo interesante entre nosotros y nuestros parientes florales. En todos los mamíferos superiores, el zigoto fertilizado es la fuente tanto del embrión como de la placenta. La placenta alimenta al embrión en desarrollo, pero no forma parte del nuevo individuo. Algo parecido ocurre cuando la fertilización tiene lugar en las plantas con flor. El proceso es algo más complicado, pero la semilla fertilizada final contiene el embrión y un tejido accesorio llamado endosperma, que se muestra en la figura 15.2.

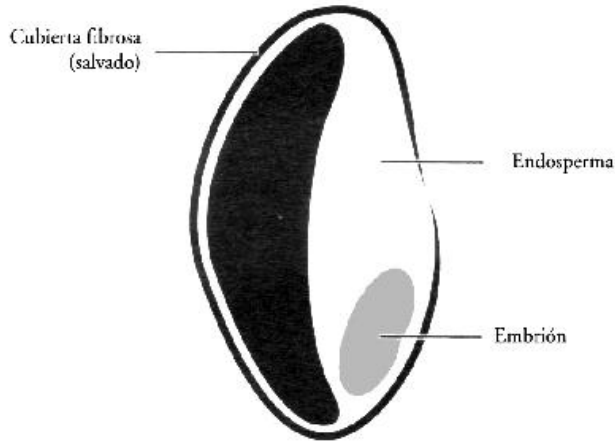

Figura 15.2: Principales componentes anatómicos de una semilla. El embrión relativamente pequeño que dará lugar a una nueva planta es alimentado por el endosperma de una forma en cierto modo análoga a cómo los embriones de los mamíferos son alimentados por la placenta.

Igual que la placenta en el desarrollo de los mamíferos, el endosperma alimenta al embrión. Promueve el desarrollo y la germinación pero no contribuye genéticamente a la siguiente generación. La presencia de cualquier tejido accesorio durante el desarrollo, ya sea una placenta o un endospermo, parece favorecer la generación del control con impronta de la expresión de un selecto grupo de genes.

De hecho, algo muy sofisticado ocurre en el endosperma de las semillas. Igual que la mayoría de los genomas animales, los genomas de las plantas con flor contienen retrotransposones. Estos reciben habitualmente el nombre de elementos transponibles (ET). Estos son los elementos repetitivos que no codifican proteínas, pero que pueden causar estragos si son activados. Esto se debe especialmente a que pueden moverse por el genoma y perturbar la expresión de los genes.

Normalmente, estos ET están muy reprimidos, pero en el endosperma estas secuencias están activadas. Las células del endosperma crean pequeñas moléculas de ARN a partir de estos ET. Estas pequeñas moléculas de ARN viajan desde el endosperma al embrión. Encuentran a los ET en el genoma del embrión que tienen la misma secuencia que ellos. Estas pequeñas moléculas de ARN parecen luego reclutar la maquinaria que desactiva permanentemente estos elementos genómicos potencialmente peligrosos. El riesgo para el genoma del endospermo debido a la reactivación de estos ET es elevado. Pero debido a que el endosperma no contribuye genéticamente a la siguiente generación, puede acometer esta misión

suicida por el bien general[10, 11, 12, 13].

Aunque tanto los mamíferos como las plantas con flor llevan impronta, parecen utilizar mecanismos levemente diferentes. Los mamíferos desactivan la copia apropiada del gen con impronta utilizando la metilación del ADN. En las plantas, la copia del gen paternamente derivada es siempre la que lleva la metilación del ADN. Sin embargo, no es siempre esta copia metilada del gen la que está desactivada[14]. En la impronta de las plantas, sin embargo, la metilación del ADN le dice a la célula cómo ha sido heredado el gen, no cómo ha de expresarse.

Hay ciertos aspectos fundamentales de la metilación del ADN que son muy semejantes en las plantas y en los animales. Los genomas de las plantas codifican enzimas de la ADN metiltransferasa, y también proteínas que pueden 'leer' ADN metilado. Igual que las células germinales primordiales en los mamíferos, ciertas células de las plantas pueden eliminar activamente la metilación del ADN. En el caso de las plantas sabemos incluso qué enzimas transportan esta reacción[15]. Una de ellas se llama DEMÉTER, por la madre de Perséfone en el mito griego. Deméter era la diosa de la cosecha y fue gracias al trato que hizo con Hades, el dios del Averno, que existen las estaciones.

Pero la metilación del ADN es también un aspecto de la epigenética en el que hay claras diferencias en la forma en que las plantas y los animales superiores utilizan el mismo sistema básico. Una de las diferencias más obvias es que las plantas no solo metilan en los motivos CpG (citosina seguida de guanina). Aunque esta es la secuencia más común que es objeto de sus ADN metiltransferasas, las plantas también metilan una citosina seguida por casi cualquier otra base[16].

Mucha metilación del ADN en las plantas está enfocada en torno a elementos repetitivos no expresados, igual que en los mamíferos. Pero una gran diferencia se hace aparente cuando examinamos el patrón de la metilación del ADN en los genes expresados. Aproximadamente un 5 por ciento de los genes de las plantas expresados tienen metilación del ADN detectable en sus promotores, pero más del 30 por ciento están metilados en las regiones que codifican aminoácidos, en el denominado cuerpo del gen. Los genes con metilación en la región del cuerpo tienden a expresarse en una amplia variedad de tejidos y se expresan en ellos a unos niveles entre moderados y elevados[17].

Los elevados niveles de metilación del ADN en elementos repetitivos de las plantas son muy parecidos al patrón en elementos repetitivos de la cromatina en animales superiores como los mamíferos. En cambio, la metilación en los cuerpos de los genes muy expresados es mucho más parecida a la de las abejas (que no metilan sus elementos

repetitivos). Esto no significa que las plantas sean un extraño híbrido epigenético de insectos y mamíferos. Al contrario, sugiere que la evolución tiene un conjunto limitado de materiales, pero no es nada obsesiva en la forma de utilizarlos.

1. Para una reseña útil, véase Dennis and Peacock (2009), J Biol 8: artículo 57.
2. Para un resumen útil del control epigenético de la vernalización, véase Ahmad et al. (2010), Molecular Plant 4: 719-728.
3. Pien et al. (2008), Plant Cell 20: 580-588.
4. Sung and Amasino (2004), Nature 427: 159-164.
5. De Lucia et al. (2008), Proc Nat Acad Sci. USA 105: 16.831-16.836.
6. Heo and Sung (2011), Science 331: 76-79.
7. Pant et al. (2008), Plant J 53: 731-738.
8. Palauqui et al. (1997), EMBO J 16: 4.738-4.745.
9. Véase, por ejemplo, Schubert et al. (2006), EMBO J 16: 4.738-4.745.
10. Gehring et al. (2009), Science 324: 1.447-1.451.
11. Hsieh et al. (2009), Science 324: 1.451-1.454
12. Mosher et al. (2009), Nature 460: 283-286.
13. Slotkin et al. (2009), Cell 136: 461-472.
14. Garnier et al. (2008), Epigenetics 3: 14-20.
15. Reseñado en Zhang et al. (2010), J Genet and Genomics 37: 1-12.
16. Chan et al. (2005), Nature Reviews Genetics 6: 351-360.
17. Cokus et al. (2008), Nature 452: 215-219.

Capítulo 16
Caminos futuros

Hacer predicciones es muy difícil, especialmente sobre el futuro.
Niels Bohr

Uno de los aspectos más apasionantes de la epigenética es el hecho de que en cierto modo resulta accesible a los no especialistas. No todos podemos tener acceso a las últimas técnicas experimentales, por lo que no podemos desentrañar los cambios en la cromatina subyacentes a los fenómenos epigenéticos. Pero todos podemos examinar el mundo que nos rodea y hacer predicciones. Lo único que tenemos que hacer es comprobar si un fenómeno satisface los dos criterios esenciales en epigenética. Con ello podremos ver el mundo natural, incluidos los humanos, bajo una luz completamente nueva. Estos dos criterios son los que hemos estado viendo una y otra vez a lo largo de este libro. Un fenómeno está probablemente influido por alteraciones epigenéticas en el ADN y en las proteínas que lo acompañan si se da una de estas condiciones, o las dos:

Dos cosas son genéticamente idénticas, pero fenotípicamente variables.

Un organismo sigue bajo la influencia de un hecho mucho después de que se haya producido este hecho.

Siempre tenemos que aplicar un filtro de sentido común, por supuesto. Si alguien pierde una pierna en un accidente de moto, el hecho de que veinte años después siga teniendo una sola pierna no significa que podamos invocar la existencia de un mecanismo epigenético para explicarlo. Por otro lado, esta persona puede seguir teniendo la sensación de que todavía tiene dos piernas. Este síndrome del miembro fantasma puede muy bien estar influido por unos patrones de expresión genética programados en el sistema nervioso central mantenidos en parte por modificaciones epigenéticas.

A veces nos sentimos tan abrumados por las tecnologías que se utilizan en la biología moderna que olvidamos lo mucho que se puede aprender simplemente mirando y reflexionando. Por ejemplo, no siempre necesitamos un sofisticado equipo de laboratorio para determinar si dos cosas fenotípicamente diferentes son genéticamente idénticas. Veamos dos ejemplos con los que todos estamos familiarizados. Las larvas se convierten en moscas y las orugas en mariposas. Una larva de mosca individual y la mosca adulta en la que

finalmente se convierte tienen que tener el mismo código genético. No es que la larva adquiera un nuevo genoma a medida que se metamorfosea. Así, la larva y la mosca utilizan el mismo genoma de formas completamente diferentes. La oruga de la vanesa de los cardos tiene púas en todo el cuerpo y es de un aburrido color gris. Como la larva, no tiene alas. La mariposa vanesa de los cardos es una criatura realmente hermosa, con unas alas enormes de color negro y naranja, y no tiene púas en el cuerpo. También en este caso, una oruga particular y la mariposa en la que se convierte tienen que tener exactamente el mismo guión de ADN. Pero el producto final de este guión es muy distinto. Es muy probable, pues, que en ello esté implicada la epigenética.

El armiño Mustela ermine se encuentra en Europa y en América del Norte. Es un pequeño y atlético depredador de la familia de las comadrejas (Mustelidae). En verano el pelaje de su dorso es de color marrón y el de su pecho de color blanco cremoso. En climas fríos, su pelaje se vuelve casi completamente blanco en invierno, excepto la punta de la cola, que sigue siendo negra. Con la llegada de la primavera, el armiño recupera sus colores veraniegos. Sabemos que para que se produzcan estos cambios estacionales en el color del pelaje se requieren unos efectos hormonales. Es perfectamente razonable inferir que estos efectos hormonales influyen en la expresión de los genes que determinan el color por métodos que incluyen modificaciones epigenéticas de la cromatina.

En los mamíferos hay normalmente una razón genética clara de por qué los machos son machos y las hembras son hembras. Un cromosoma Y funcional lleva al fenotipo del macho. En muchas especies de reptiles, incluidos los cocodrilos y los caimanes, los dos sexos son genéticamente idénticos. No es posible predecir el sexo de un cocodrilo a partir de sus cromosomas. El sexo de un cocodrilo o de un caimán depende de la temperatura durante unas fases críticas del desarrollo del huevo –se utiliza un mismo guión para producir un cocodrilo macho o un cocodrilo hembra[1]. Sabemos que la señalización hormonal interviene en este proceso. No se ha investigado mucho si las modificaciones epigenéticas desempeñan o no un papel importante en el establecimiento o en la estabilización de los patrones de expresión genética relacionados con la identidad sexual, pero parece probable que sí lo hagan.

Comprender los mecanismos de la determinación del sexo en los cocodrilos y en otras especies con ellos relacionadas puede convertirse en el futuro en un tema esencial de la conservación. El cambio global de las temperaturas debido al fenómeno del cambio climático puede tener consecuencias negativas para estos reptiles si las poblaciones sufren una desviación importante a favor de uno u otro sexo. Algunos

autores han incluso especulado que dicho efecto puede haber contribuido a la extinción de los dinosaurios[2].

Las ideas que acabamos de exponer son hipótesis bastante sencillas y fácilmente comprobables. Podemos generar otras muchas hipótesis como estas basándonos en la simple observación. Es mucho más arriesgado hacer afirmaciones generales acerca de qué otros desarrollos podemos esperar que se produzcan en la investigación epigenética. El campo es todavía muy joven y se está moviendo en varias direcciones inesperadas. Pero si aceptamos quedar al albur de la fortuna, podemos hacer unas cuantas predicciones.

Empezaremos con una predicción muy concreta. Antes del 2016 al menos un premio Nobel de Fisiología o Medicina será concedido a algunos de los investigadores que trabajan en este campo. La cuestión es a quién, porque hay muchos candidatos que se lo merecen.

Para muchos de los que trabajan en este campo resulta asombroso que todavía no se lo hayan concedido a Mary Lyon por su obra notablemente clarividente sobre la desactivación X. Aunque los trabajos en los que estableció el marco conceptual de la desactivación X no contenían muchos datos experimentales, algo parecido podría decirse del trabajo original de James Watson y Francis Crick sobre la estructura del ADN[3]. Resulta tentador especular que todavía no se le ha concedido un Nobel a una mujer por razones de género, aunque esto es en parte debido a un mito forjado en torno a Rosalind Franklin. Ella era la cristalógrafa de rayos X cuyos datos fueron esenciales para el desarrollo del modelo Watson-Crick del ADN. Cuando se concedió el premio Nobel a Watson y Crick en 1962 se concedió también al jefe del laboratorio donde trabajaba ella, el profesor Maurice Wilkins, del King College de Londres. Pero Rosalind Franklin no se perdió el premio porque era una mujer. Se lo perdió, trágicamente, porque había muerto a los 37 años de un cáncer de ovarios, y el premio Nobel nunca se concede póstumamente.

Bruce Cattanach es un científico a quien nos hemos encontrado antes en este libro. Además de su trabajo sobre los efectos “progenitor de origen”, también llevó a cabo los primeros estudios experimentales sobre los mecanismos moleculares subyacentes a la desactivación X[4].La mayoría de investigadores lo considerarían un buen candidato a compartir el premio con Mary Lyon. Tanto Mary Lyon como Bruce Cattanach llevaron a cabo sus principales investigaciones en los años sesenta, y ya hace tiempo que están jubilados. Sin embargo, Robert Edwards, el pionero de la fertilización in vitro, recibió el premio Nobel del 2010 a los ochenta y tantos años, de modo que a la profesora Lyon y al profesor Cattanach todavía les queda algo de tiempo y de esperanza.

El trabajo de John Gurdon y Shinya Yamanaka sobre la

reprogramación celular ha revolucionado nuestro conocimiento sobre cómo se controla el destino de las células, y ambos son probables candidatos a viajar pronto a Estocolmo. Otra combinación menos central pero igualmente atractiva sería la formada por Azim Surani y Emma Whitelaw. Conjuntamente, su trabajo ha sido fundamental para demostrar no solamente que el epigenoma es normalmente puesto a cero en la reproducción sexual, sino también cómo este proceso se ve ocasionalmente subvertido para permitir la herencia de caracteres adquiridos. David Allis ha dirigido el campo en el estudio de las modificaciones epigenéticas en las histonas, y sería también una buena opción al Nobel, posiblemente en combinación con algunas de las estrellas en el campo de la metilación del ADN, especialmente Adrian Bird y Peter Jones.

Peter Jones ha sido un pionero en el desarrollo de las terapias epigenéticas y esta es otra área de crecimiento en el campo de la epigenética. Los inhibidores de la deacetilasa de la histona y los inhibidores de la ADN metiltransferasa han estado en la vanguardia de estos enfoques. La inmensa mayoría de ensayos clínicos con estos compuestos lo han sido con el cáncer, pero esto está empezando a cambiar. Un inhibidor de las sirtuinas, una clase de deacetilasas de la histona, se utiliza actualmente en ensayos clínicos con la enfermedad de Huntington, un devastador trastorno neurodegenerativo hereditario[5].La atención, tanto por lo que respecta al cáncer como por lo que respecta a trastornos no oncológicos, se centra actualmente en el desarrollo de fármacos para inhibir a las enzimas epigenéticas más orientadas. Entre estas enzimas están las que cambian solo una modificación en la posición de un aminoácido concreto en las histonas. Cientos de millones de dólares se están invirtiendo en este campo en todo el mundo, tanto por parte de nuevas compañías de biotecnología como por las grandes empresas farmacéuticas. Es probable que veamos los nuevos fármacos para el tratamiento del cáncer surgidos de estos esfuerzos en fase de ensayos clínicos en los próximos cinco años, y para el tratamiento de otras enfermedades no tan inmediatamente graves como el cáncer en menos de una década[6].

Nuestro conocimiento cada vez mayor de la epigenética, y especialmente de la herencia transgeneracional, puede crear también problemas, además de nuevas oportunidades, en el descubrimiento de nuevas drogas. Si creamos nuevas drogas que interfieran con los procesos epigenéticos, ¿no es posible que estas drogas también afecten a la reprogramación que normalmente se produce durante la producción de células germinales? Teóricamente esto podría producir cambios fisiológicos que no solo afectasen a la persona tratada con estas drogas, sino también a sus hijos y a sus nietos. Es probable también que no tengamos que limitar nuestra preocupación a aquellas

sustancias químicas específicamente orientadas a las enzimas epigenéticas. Como vimos en el capítulo 8, el contaminante ambiental vinclozolina puede afectar a los roedores durante varias generaciones. Si las autoridades encargadas de dar el visto bueno a nuevos fármacos insisten en la necesidad de realizar estudios transgeneracionales, esto complicará enormemente el coste y la complejidad del desarrollo de nuevas drogas.

A primera vista esto podría parecer muy razonable; al fin y al cabo, queremos que los fármacos que tomamos sean seguros. Pero ¿qué hay de todos aquellos pacientes que necesitan desesperadamente un nuevo fármaco para librarse de una enfermedad que amenaza sus vidas, o a los que necesitan una nueva medicina para poder vivir de una forma más digna y libre del dolor y de la invalidez? Cuanto más tiempo se tarde en introducir nuevos fármacos en el mercado, más tiempo sufrirán estos pacientes. Será interesante ver cómo abordan este problema en los próximos diez o quince años las compañías farmacéuticas, las autoridades reguladoras y los grupos de defensa de los pacientes.

Los efectos transgeneracionales de los cambios epigenéticos puede ser uno de los campos con un mayor impacto en la salud humana durante las próximas décadas, no tanto debido a los contaminantes ambientales o a los fármacos, sino a los alimentos. Empezamos este viaje por el paisaje epigenético estudiando la Hambruna Invernal Holandesa. Este episodio tuvo consecuencias no solo por quienes lo vivieron sino también para sus descendientes. Asistimos actualmente a una epidemia global de obesidad. Aunque consigamos controlarla (y pocas de las culturas occidentales parecen capaces de hacerlo), vamos a dejar un legado epigenético menos que óptimo a nuestros hijos y nietos.

La nutrición en general es uno de los campos en los que podemos predecir que la epigenética ocupará el primer plano en los próximos diez años. Veamos unos cuantos ejemplos de lo que ya sabemos.

El ácido fólico es uno de los suplementos vitamínicos recomendados a las mujeres embarazadas. La administración de ácido fólico durante las primeras fases del embarazo ha sido muy beneficiosa para la salud pública por cuanto ha llevado a un importante descenso en la incidencia de malformaciones como la espina bífida en los recién nacidos[7]. El ácido fólico es necesario para la producción de una sustancia química llamada SAM (S-adenosil metionina). SAM es la molécula que da el grupo metilo cuando las ADN metiltransferasas modifican el ADN. Si a las crías de rata se les aplica una dieta baja en ácido fólico desarrollan una regulación anormal de las regiones con impronta del genoma[8]. Estamos solo comenzando a desentrañar de qué modo muchos de los efectos beneficiosos del ácido fólico pueden

ser mediatizados por mecanismos epigenéticos.

Los inhibidores de las deacetilasas de las histonas en nuestras dietas también pueden desempeñar un papel útil en la prevención del cáncer y posiblemente también de otras enfermedades. De momento los datos son relativamente especulativos. El butorato de sodio del queso, el sulforafano del brócoli y el dialil disulfito en el ajo son débiles inhibidores de las deacetilasas de las histonas. Los investigadores han formulado la hipótesis según la cual la liberación de estos compuestos presentes en la comida durante la digestión puede contribuir a modular la expresión genética y la proliferación celular en el intestino[9]. En teoría, esto podría reducir el riesgo de desarrollar cambios cancerígenos en el colon. Las bacterias de nuestro intestino también producen butirato de forma natural descomponiendo la comida[10], especialmente los alimentos de origen vegetal, lo cual es otro buen motivo para consumir verdura.

Hay un estudio especulativo pero muy interesante realizado en Islandia sobre cómo la dieta puede influir epigenéticamente en una enfermedad. Se trata de un raro trastorno genético llamado angiopatía amiloide hereditaria por cistatina C, que causa la muerte prematura por apoplejía. En las familias islandesas en las que algunos de sus miembros sufren esta enfermedad, los pacientes tienen una mutación particular en un gen clave. Debido al carácter relativamente aislado de las sociedades islandesas y al excelente registro de historiales que se lleva en aquel país, los investigadores pudieron seguir el rastro de esta enfermedad en muchas de las familias afectadas. Lo que encontraron fue muy notable. Hasta 1820 aproximadamente, las personas que tenían esta mutación vivían más o menos hasta los 60 años antes de sucumbir a la enfermedad. Entre 1820 y 1900 la esperanza de vida de quienes padecían este trastorno cayó hasta los 30 años, y todavía sigue así. Los científicos especularon en su trabajo original que un cambio medioambiental que había tenido lugar después de 1820 habría alterado la forma en que las células responden a los efectos de la mutación para controlarla[11].

En una conferencia realizada en Cambridge en el 2010 los mismos autores de este trabajo afirmaron que uno de los principales cambios ambientales en Islandia desde 1820 hasta la actualidad había sido un cambio en la dieta tradicional islandesa a favor de una dieta más parecida a la imperante en el continente europeo[12]. La dieta tradicional islandesa contenía cantidades excepcionalmente elevadas de pescado fresco y mantequilla fermentada. Esta última contiene mucho ácido butírico, el débil inhibidor de la deacetilasa de la histona. Los inhibidores de las deacetilasas de las histonas pueden alterar la función de las fibras musculares en los vasos sanguíneos[13], lo que es relevante para el tipo de ataques que sufren los pacientes con

esta mutación. No hay todavía pruebas formales de que haya sido la reducción del consumo de inhibidores de las deacetilasas de las histonas lo que ha llevado a una muerte más prematura en este grupo de pacientes, pero esta es una hipótesis fascinante.

La ciencia fundamental de la epigenética es el campo en el que más difícil resulta hacer predicciones. Una apuesta bastante segura es que los mecanismos epigenéticos seguirán apareciendo en lugares inesperados. Un buen ejemplo reciente de ello lo tenemos en el campo de los ritmos circadianos, el ciclo natural fisiológico y bioquímico de 24 horas que encontramos en muchas especies vivas. Se ha demostrado que una histona acetiltransferasa es la proteína clave implicada en el establecimiento de estos ritmos[14], y en el ajuste de los mismos está implicada al menos otra enzima epigenética[15].

También es probable que encontremos que algunas enzimas epigenéticas influyen de muchas maneras diferentes en las células. Esto es debido a que unas cuantas de estas enzimas no solo modifican a la cromatina. También pueden modificar a otras proteínas en la célula, con lo que pueden actuar en muchos sitios a la vez. De hecho, se ha propuesto que algunas de las histonas que modifican a los genes evolucionaron en realidad antes de que las células contuvieran histonas[16]. Esto daría a entender que estas enzimas cumplían originalmente otras funciones, y que han sido forzadas por la evolución a convertirse en controladoras de la expresión de los genes. No sería sorprendente, por tanto, encontrar que algunas de estas enzimas desempeñan una función doble en nuestras células.

Algunos de los aspectos más fundamentales de la maquinaria molecular de la epigenética siguen estando envueltos en el misterio. Nuestro conocimiento de cómo se establecen unas modificaciones específicas en determinadas posiciones del genoma es puramente esquemático y superficial. Empezamos a ver qué papel desempeñan los ARN no codificantes en este proceso, pero hay muchas lagunas en nuestro conocimiento. Del mismo modo, no tenemos apenas idea de cómo se transmiten de la célula madre a las células hijas las modificaciones de las histonas. Estamos bastante seguros de que esto es lo que sucede, pues es algo que forma parte de la memoria molecular de las células y que les permite mantener el destino celular, pero no sabemos cómo sucede. Cuando el ADN es duplicado, las proteínas histonas son desplazadas a un lado. La nueva copia de ADN puede terminar con relativamente pocas de las histonas modificadas. Puede en cambio estar cubierta de histonas vírgenes con apenas modificaciones. Esto es rápidamente corregido, pero apenas entendemos cómo sucede, aunque este es uno de los temas más fundamentales en el campo de la epigenética.

Es posible que no podamos resolver este misterio hasta que

tengamos la tecnología y la imaginación para dejar de pensar en dos dimensiones y pasar a un mundo tridimensional. Nos hemos acostumbrado a pensar en el genoma en términos lineales, como tiras de bases que son simplemente leídas de una forma sencilla. Pero la realidad es que diferentes regiones del genoma se doblan y se retuercen, uniéndose unas con otras y creando nuevas combinaciones y subgrupos reguladores. Pensamos en nuestro material genético como en un guión normal, pero se parece más al desplegable de la parte final de la revista Mad, en la que doblando una imagen de una forma determinada se crea una nueva imagen. Comprender este proceso puede ser crítico a la hora de desentrañar cómo las modificaciones epigenéticas y las combinaciones de genes trabajan conjuntamente para crear esos milagros que son el gusano, el roble o el cocodrilo.

O nosotros.

Este es, pues, un resumen de lo que nos depara la investigación epigenética en la próxima década. Habrá esperanza y exageraciones, promesas excesivas, callejones sin salida, caminos equivocados y de vez en cuando incluso alguna investigación desacreditada. La ciencia es una empresa humana y a veces se descarría. Pero dentro de unos diez años tendremos respuestas para algunas de las preguntas más importantes de la biología. Ahora mismo somos incapaces de predecir cuáles serán estas respuestas, y en algunos casos ni siquiera estamos seguros de que las preguntas estén bien planteadas, pero una cosa es cierta.

La revolución epigenética ya está en marcha.

1. Para una reseña reciente, véase Wapstra y Warner (2010), Sex Dev. 4: 110-8.
2. Miller et al. (2004), Fertil Steril 81: 954-64.
3. Watson, J. D. y Crick, F. H. C. (1953), Nature 171: 737-738.
4. Cattanach y Isaacson (1967), Genetics 57: 231-246.
5. Para más información, véase http://www.sienabiotech.com
6. Mack, G.S. (2010), Nat Biotechnol. 28: 1.259-66.
7. MRC Vitamin Study Research Group (1991), Lancet 338: 131-7.
8. Waterland et al. (2006), Hum Mol Genet. 15: 705-716.
9. Reseñado en Calvanese et al. (2009), Ageing Research Reviews 8: 268-276.
10. Reseñado en Guilloteau et al. (2010), Res. Rev. 23: 366-84.
11. Palsdottir et al. (2008), PLoS Genet, 20 de junio, 4: e1000099.
12. Extracto de Palsdottir et al. (2010), Wellcome Trust Conference on Signalling to Chromatin Hinxton UK.
13. Véase por ejemplo Okabe et al. (1995), Biol PharmBull. 18: 1.665-70.
14. Nakahata et al. (2008), Cell 134: 320-340.
15. Katada et al. (2010), Nat Struct Mol Biol. 17: 1.414-21.

16. Gregoretti et al. (2004), J. Mol Biol. 338: 17-31.

Table of Contents

Índice
Introducción
1. Un sapo feo y un hombre elegante
2. Cómo aprendimos a rodar cuesta arriba
3. La vida tal como la conocíamos
4. La vida tal como la conocemos
5. ¿Por qué los gemelos idénticos no son realmente idénticos?
6. Los pecados de los padres
7. El juego de las generacions
8. La batalla de los sexos
9. Generación X
10. El mensaje no es el medio
11. Luchando contra el enemigo interior
12. Todo está en la mente
13. Yendo cuesta abajo
14. Larga vida a la reina
15. La revolución verde
16. Caminos futuros